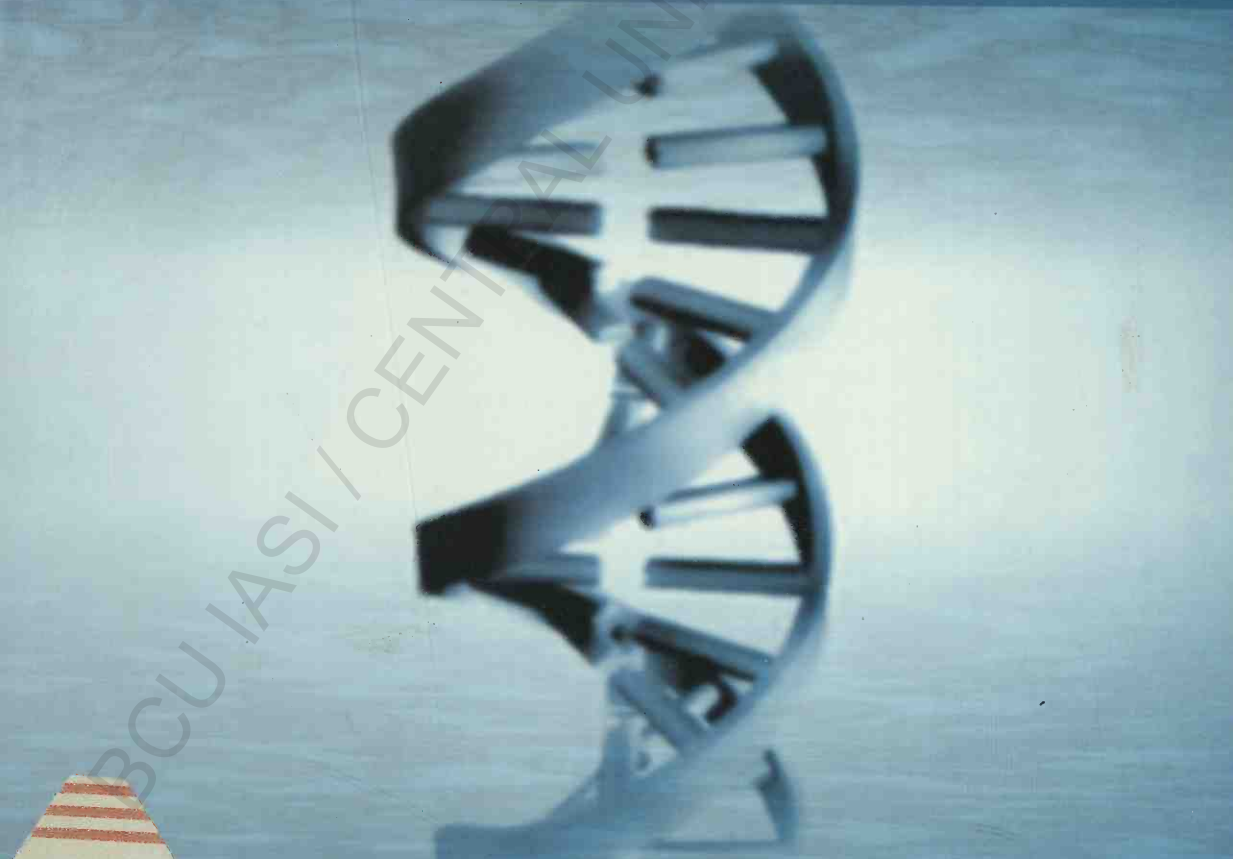
Dragoş Lucian Gorgan

FILOGENIE MOLECULARĂ

ÎN CADRUL GENURILOR *CYPRINUS* ŞI *CARASSIUS*



BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

12.123

Editura Universităţii „Alexandru Ioan Cuza“ Iaşi

Dragoş Lucian Gorgan

Filogenie moleculară în cadrul genurilor *Cyprinus* şi *Carassius*

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Volumul se tipăreşte printr-un Program finanţat de CNCSIS, A_T 186/2006

Referenţi ştiinţifici:

Prof.univ.dr. Ion I. BĂRA
Universitatea „Alexandru Ioan Cuza" Iaşi

Prof.univ.dr. Vlad ARTENIE
Universitatea „Alexandru Ioan Cuza" Iaşi

Coperta: Manuela OBOROCEANU
Redactor: Dana ZĂMOSTEANU

ISBN 978 – 973 – 703 – 209 – 6
973 – 703 – 209 – 8

© Editura Universităţii „Alexandru Ioan Cuza", 2007
700511 – Iaşi, str. Păcurari, nr. 9, tel./fax: (0232) 314947

BCU IASI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

adO III – 12123

20 lei

Dragoş Lucian Gorgan

Filogenie moleculară în cadrul genurilor *Cyprinus* şi *Carassius*

659318
B.C.U. IASI

EDITURA UNIVERSITĂŢII „ALEXANDRU IOAN CUZA"
IAŞI – 2007

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

ado
B.C.U. „M. EMINESCU" IAȘI
BIOLOGIE
14 JUL 2008

Descrierea CIP a Bibliotecii Naționale a României
GORGAN, LUCIAN DRAGOȘ
Filogenie moleculară în cadrul genurilor Cyprinus și Carassius, Dragoș Lucian Gorgan - Iași : Editura Universității „Al.I. Cuza", 2007
Bibliogr.
ISBN 973 – 703 – 209 – 8
978 – 973 – 703 – 209 – 6

597.551.1
597.551.3

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

CUPRINS

INTRODUCERE 9
SCOPUL CERCETĂRILOR 15
1. CARACTERIZAREA BIOLOGICĂ A REPREZENTANȚILOR FAMILIEI *CYPRINIDAE* 17
1.1. Încadrarea sistematică 17
1.1.1. Lista de specii 22
1.1.2. Hibrizi interspecifici de ciprinide 25
1.2. Caracterizarea genetică a familiei *Cyprinidae* 25
2. GINOGENEZĂ ȘI HIBRIDARE ÎN CADRUL FAMILIEI *CYPRINIDAE* 33
2.1. Tehnologia obținerii descendenților ginogenetici diploizi la *Cyprinus carpio* L 33
2.1.1. Proprietățile descendenților ginogenetici 33
2.1.2. Tehnologia obținerii descendenților ginogenetici diploizi 34
2.1.2.1. Pregătirea icrelor în vederea însămânțării 34
2.1.2.2. Inactivarea genetică a spermatozoizilor 34
2.1.2.3. Obținerea descendenților ginogenetici 35
2.1.2.4. Stabilirea originii ginogenetice a peștilor 35
2.1.2.5. Obținerea descendenței ginogenetice la crap utilizând gameți manipulați genetic 36
2.2. Hibridarea, consangvinizarea și heterozisul 40
2.2.1. Liniile pure și vigoarea hibridă 42
2.2.2. Efectele genetice ale consangvinizării 44
2.2.3. Consangvinizarea și heterozisul – importanța lor practică 46
2.2.4. Hibridarea interspecifică 47
3. FILOGENIE MOLECULARĂ ÎN CADRUL FAMILIEI *CYPRINIDAE* 51
3.1. Importanța biologiei moleculare în determinarea direcțiilor evolutive 51
3.2.Rolul ADN mitocondrial (ADNmt) 52
3.2.1. Structura ADNmt la speciile studiate 53
3.2.2. Tipuri de modificări la nivelul macromoleculei de ADN 54
3.3. Mutațiile și rata de substituție a aminoacizilor 56
4. MATERIAL ȘI METODE 59
4.1. Determinarea unor parametri și indici fenotipici la indivizii studiați 59
4.2. Protocolul de extracție al ADN total 62
4.2.1. Prelucrarea statistică a datelor obținute din extracția ADN 67
4.2.1.1. Estimarea valorilor medii ale populațiilor și stabilirea intervalelor de variabilitate 67
4.2.1.2. Compararea mai multor probe 68
4.3. Reacția de amplificare genică prin polimerizare în lanț 70
4.3.1. Principii generale 70
4.3.2. Ciclurile de replicare 71
4.3.2.1. Denaturarea 71
4.3.2.2. Alinierea primerilor 71
4.3.2.3. Extensia 72
4.3.2.4. Condițiile de reacție 72
4.3.3. Componentele PCR 73
4.3.4. Amplificarea genică la *Carassius auratus gibelio* și *Cyprinus carpio* 73
4.3.4.1. Amplificarea genei care determină sinteza citocromului b 74
4.3.4.2. Amplificarea regiunii de control mitocondrial la *Carassius auratus gibelio* Bloch și *Cyprinus carpio* L 78
4.3.4.3. Amplificarea genei ce codifică subunitatea 4L a dehidrogenazei (ND4L) 81

BCU CLUJ - UNIVERSITY LIBRARY

4.4. Testarea produşilor PCR prin electroforeză în gel de agaroză 83
4.5. Purificarea produşilor PCR în coloane Qiagen 84
4.6. Cuantificarea produşilor PCR 85
4.6.1. Prepararea gelului de cuantificare 85
4.6.2. Pregătirea probelor pentru cuantificare 85
4.6.3. Cuantificarea probelor 86
4.7. Reacţia de secvenţiere 87
4.7.1. Reacţia de secvenţiere a genei ce codifică informaţia sintezei citocromului b la *Carassius auratus gibelio* Bloch şi *Cyprinus carpio* L 88
4.7.2. Reacţia de secvenţiere a regiunii de control mitocondrial (d-loop) la *Carassius auratus gibelio* Bloch şi *Cyprinus carpio* L 89
4.7.3. Reacţia de secvenţiere a ND4L la *Cyprinus carpio* L. şi *Carassius auratus gibelio* Bloch 90
4.8. Precipitarea în etanol a probelor pentru secvenţiere (Beckman Coulter Protocols) 90
4.9. Analiza secvenţelor 92
4.9.1. Modificări evolutive ale secvenţelor de ADN 92
4.9.1.1. Diferenţe nucleotidice între secvenţe 92
4.9.2. Estimarea numărului de substituţii nucleotidice 92
4.9.2.1. Modelul Jukes-Cantor 93
4.9.2.2. Modelul Tamura-Nei 95
4.9.2.3. Distanţe gamma 95
4.9.2.4. Varianţa şi covarianţa bootstrap (replicărilor repetate) 96
4.10. Arbori filogenetici 98
4.10.1. Inferenţa filogenetică – Metode bazate pe distanţă 99
4.10.1.1. UPGMA 99
4.10.1.1.1. Algoritmul UPGMA 99
4.10.1.2. Metoda evoluţiei minime (ME) 101
4.10.1.3. Metoda Neighbor-Joining (NJ) 102
4.10.1.3.1.Algoritmul Neighbor-Joining 103
4.10.2. Metoda Maximum Parsimony 108
5. REZULTATE ŞI DISCUŢII 111
5.1. Stabilirea omogenităţii loturilor 111
5.2.Amplificarea genelor care determină sinteza citocromului b a ND4L dehidrogenazei şi a d-loop la specii ale genurilor *Cyprinus* şi *Carassius* 118
5.3. Cuantificarea amplificării genelor clonate în vederea secvenţierii 123
5.4. Secvenţierea genelor care deţin informaţia sintezei citocromului b a regiunii de control mitocondrial şi a subunităţii 4L a dehidrogenazei 132
5.5. Compararea secvenţelor nucleotidice ale genei care determină sinteza citocromului b provenite de la indivizi aparţinând genului *Cyprinus* 132
5.5.1.Caracterizarea haplotipului general al celor două populaţii (Cy01I) 136
5.5.1.1. Frecvenţele tipurilor de asocieri nucleotidice 136
5.5.1.2.Modelarea structurii secundare a ARNm 139
5.5.1.3.Translaţia şi caracterizarea catenei polipeptidice 140
5.5.2. Caracterizarea haplotipului Cy04I 143
5.5.2.1. Frecvenţele tipurilor de asocieri nucleotidice 143
5.5.2.2. Modelarea structurii secundare a ARNm 145
5.5.2.3. Translaţia şi caracterizarea catenei polipeptidice 145
5.5.3. Caracterizarea haplotipului Cy0104M 147
5.5.3.1. Frecvenţele tipurilor de asocieri nucleotidice 147
5.5.3.2. Modelarea structurii secundare a ARNm 150
5.5.3.3. Translaţia şi caracterizarea catenei polipeptidice 150

BCU CLUJ / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

5.5.4. Caracterizarea haplotipului Cy03M 151
5.5.4.1.Frecvenţele tipurilor de asocieri nucleotidice 151
5.5.4.2. Modelarea structurii secundare a ARNm 154
5.5.4.3. Translaţia şi caracterizarea catenei polipeptidice 154
5.5.5. Caracterizarea haplotipului Cy06M 157
5.5.5.1. Frecvenţele tipurilor de asocieri nucleotidice 157
5.5.5.2. Modelarea structurii secundare a ARNm 160
5.5.5.3. Translaţia şi caracterizarea catenei polipeptidice 161
5.5.6. Relaţii filogenetice în cadrul genului *Cyprinus* bazate pe diferenţe ale secvenţelor genei care determină sinteza citocromului b 164
5.6. Compararea secvenţelor nucleotidice ale regiunii de control mitocondrial provenite de la indivizi aparţinând genului *Cyprinus* 168
5.6.1. Caracterizarea haplotipului general al celor două populaţii 171
5.6.1.1. Frecvenţele tipurilor de asocieri nucleotidice 171
5.6.1.2. Modelarea structurii secundare a ARNm 174
5.6.2. Caracterizarea haplotipului Cy01M 175
5.6.2.1. Frecvenţele tipurilor de asocieri nucleotidice 175
5.6.2.2. Modelarea structurii secundare a ARNm 178
5.6.3. Caracterizarea haplotipului Cy05M 178
5.6.3.1. Frecvenţele tipurilor de asocieri nucleotidice 178
5.6.3.2. Modelarea structurii secundare a ARNm 181
5.6.4. Caracterizarea haplotipului Cy06M 181
5.6.4.1. Frecvenţele tipurilor de asocieri nucleotidice 181
5.6.4.2. Modelarea structurii secundare a ARNm 185
5.6.5. Relaţii filogenetice în cadrul genului *Cyprinus* bazate pe diferenţe ale secvenţelor d-loop 186
5.7. Compararea secvenţelor nucleotidice ale genei ce determină sinteza subunităţii 4L a dehidrogenazei provenite de la indivizi aparţinând genului *Cyprinus* 189
5.7.1. Caracterizarea haplotipului general al celor două populaţii (Cy01IM) 192
5.7.1.1. Frecvenţele tipurilor de asocieri nucleotidice 192
5.7.1.2. Modelarea structurii secundare a ADNm 195
5.7.1.3. Translaţia şi caracterizarea catenei polipeptidice 195
5.7.2. Relaţii filogenetice în cadrul genului *Cyprinus* bazate pe diferenţe ale secvenţelor ND4L 199
5.8. Compararea secvenţelor nucleotidice ale genei ce determină sinteza citocromului b provenite de la indivizi aparţinând genului *Carassius* 202
5.8.1. Caracterizarea haplotipului general al celor două populaţii (CagIMY) 206
5.8.1.1. Frecvenţele tipurilor de asocieri nucleotidice 206
5.8.1.2. Modelarea structurii secundare a ARNm 209
5.8.1.3. Translaţia şi caracterizarea catenei polipeptidice 210
5.8.2. Caracterizarea haplotipului Cag137IM 213
5.8.2.1. Frecvenţele tipurilor de asocieri nucleotidice 213
5.8.2.2. Modelarea structurii secundare a ARNm 216
5.8.2.3. Translaţia şi caracterizarea catenei polipeptidice 216
5.8.3. Relaţii filogenetice în cadrul genului *Carassius* bazate pe diferenţe ale secvenţelor genei ce determină sinteza citocromului b 217
5.9. Compararea secvenţelor nucleotidice ale regiunii de control mitocondrial provenite de la indivizi aparţinând genului *Carassius* 221
5.9.1. Caracterizarea haplotipului general al celor două populaţii (CagIMD) 225
5.9.1.1. Frecvenţele tipurilor de asocieri nucleotidice 225
5.9.1.2. Modelarea structurii secundare a ARNm 228
5.9.2. Caracterizarea haplotipului Cag251D 229

5.9.2.1. Frecvențele tipurilor de asocieri nucleotidice 229
5.9.2.2. Modelarea structurii secundare a ARNm 232
5.9.3. Relații filogenetice în cadrul genului *Carassius* bazate pe diferențe ale secvențelor regiunii de control mitocondrial 233
5.10. Compararea secvențelor nucleotidice ale genei ce determină sinteza subunității 4L a dehidrogenazei provenite de la indivizi aparținând genului *Carassius* 237
5.10.1. Caracterizarea haplotipului general al celor două populații (CagIMN) 240
5.10.1.1.Frecvențele tipurilor de asocieri nucleotidice 240
5.10.1.2. Modelarea structurii secundare a ARNm 243
5.10.1.3. Translația și caracterizarea catenei polipeptidice 244
5.10.2. Relații filogenetice în cadrul genului *Carassius* bazate pe diferențe ale secvențelor genei ce determină sinteza ND4L 247
5.11. Direcții evolutive în cadrul familiei *Cyprinidae* 250
CONCLUZII 261
ANEXA 1 265
ANEXA 2 285
ANEXA 3 293
ANEXA 4 301
ANEXA 5 311
ANEXA 6 319
ANEXA 7 323
ANEXA 8 327
ANEXA 9 333
ANEXA 10 335
ANEXA 11 347
ANEXA 12 353
ANEXA 13 359
ANEXA 14 361
ANEXA 15 363
ANEXA 16 369
BIBLIOGRAFIE 373

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

INTRODUCERE

Luând în considerație numărul de specii, diversitatea de forme și grade de evoluție, se poate afirma că peștii formează „o lume aparte" (Taisescu, 1979) în lumea vertebratelor. Clasificarea lor complexă în 32 ordine, 80 subordine și peste 400 de familii (Greenwood *et al.*, 1996, citat de Taisescu, 1979) este o expresie elocventă a marii diversități care caracterizează clasa *Pisces*.

Chiar dacă nu se ia în considerare numărul mare de indivizi care aparțin unei specii, clasa peștilor numără mai multe specii decât toate celelalte clase de vertebrate la un loc. Astfel, numai speciile de teleosteeni sunt estimate la peste 20.000, ceea ce înseamnă aproximativ 60% din totalul vertebratelor actuale (la care se adaugă amfibienii, aproximativ 2.500 specii, reptilele 6.000 specii, păsări 8.600 specii și mamifere 4.500 specii).

Pe lângă avantajul unei imense variabilități pe care o oferă numărul mare de specii, peștii sunt înzestrați cu cel mai bun material (cel puțin dintre vertebrate), pentru studii citogenetice. Deoarece prezintă avantajul încrucișării artificiale intra- și interspecifice, la care se adaugă și faptul că sunt foarte ușor de întreținut, peștii constituie pentru cercetările de genetică un material comparabil și din unele puncte de vedere chiar superior *Drosophilei*.

Având în vedere că diferitele specii de pești prezintă anumite particularități care le diferențiază sub aspectul ritmului de creștere, al rezistenței la boli, al modului de valorificare a hranei etc., este necesară obținerea unor forme cu caracteristici bioproductive superioare acestora, care să îmbine caracterele lor pozitive.

Ciprinidele reprezintă una dintre cele mai răspândite familii de pești, cu mai mult de 2.000 specii grupate în aproximativ 340 genuri (Bănărescu și Coad, 1991). Peștii din această familie au atras atenția evoluționiștilor, datorită arealelor mari pe care le prezintă pe toate continentele și prezenței lor în majoritatea ecosistemelor de apă dulce. Cu toate acestea, de când Cuvier (1817) a stabilit această familie, relațiile sistematice din cadrul său au fost permanent discutate. Primele clasificări ale ciprinidelor se bazau în principal pe caractere externe (ex. prezența, tipul și numărul mustăților), precum și structura și aranjarea dinților faringieni (Howes, 1991). Recent, caracterele osteologice au fost de asemenea folosit în determinarea relațiilor filogenetice în cadrul diferitelor grupe de ciprinide (ex. genul *Barbus*; Doadrio, 1990). Dar liniile monofiletice și relațiile de înrudire dintre subfamiliile familiei *Cyprinidae* (ex. *Cyprininae*, *Leuciscinae* și *Rasborinae*) trebuie stabilite cu exactitate (Howes, 1991).

B.C.U. „M. EMINESCU" IAȘI
BIOLOGIE

Uşurinţa cu care pot fi manevraţi gameţii, fecundaţia externă şi posibilitatea de control a dezvoltării zigotului după fertilizare fac ca tehnici de o deosebită importanţă practică cum ar fi manipularea cromosomilor sau a seturilor de cromosomi, frecvent folosit în genetica plantelor, să se poată aplica la peştii de cultură în vederea creşterii productivităţii.

Ginogeneza reprezintă o formă rară de înmulţire sexuală. În cazul ginogenezei, fecundarea este necesară (prin fecundare înţelegând pătrunderea spermatozoidului în oosferă), dar cromosomii spermatozoidului nu se transmit descendenţei.

De aceea, dezvoltarea descendenţelor ginogenetice decurge numai pe baza eredităţii materne. În funcţie de particularităţile citologice, descendenţele ginogenetice fie că repetă în întregime forma maternă (ginogeneza ameiotică), fie că, datorită dezbinării, se deosebesc de forma maternă prin anumite criterii (ginogeneza meiotică).

Ginogeneza este cunoscută în natură şi poate fi provocată experimental. Ginogeneza naturală (de regulă ameiotică) este asigurată de către nişte mecanisme biologice, care realizează inactivarea cromosomilor spermatozoidului care a pătruns în oosferă şi elimină reducerea cromosomilor femeli în cadrul procesului de maturare a oosferei. Datorită acestui fapt, icrele femelelor care se înmulţesc prin ginogeneză conţin un set complet de cromosomi materni şi unul redus la jumătate (aşa cum se întâmplă în cazul înmulţirii sexuale obişnuite).

În cazul ginogenezei induse, ambele particularităţi remarcate mai sus, adică inactivarea genetică a cromosomilor masculi şi eliminarea reducerii cromosomilor femeli, sunt asigurate prin intervenţii experimentale (în cazuri rare, diploidizarea cromosomilor femeli apare şi în mod spontan).

Prioritatea în elaborarea metodelor de obţinere a ginogenezei induse la peşti aparţine cercetătorilor sovietici D.D. Romaşev, K.A. Colovinscaia şi V.N. Beliaeva, care în anii 1950-1960 au demonstrat experimental posibilitatea ginogenezei diploide induse la crap şi ţipar şi au obţinut primele date referitoare la proprietăţile descendenţelor ginogenetice. În prezent, ginogeneza meiotică indusă este realizată la multe specii de peşti, dar procentul cel mai mare îl constituie cea indusă la specii aparţinând familiei *Cyprinidae*.

Din punct de vedere teoretic, extinderea studiilor privind în principal, ginogeneza şi hibridarea, consangvinizarea şi heterozisul a permis înţelegerea mai profundă a eredităţii organismelor, a modalităţilor de transmitere a caracterelor ereditare de-a lungul generaţiilor. S-a putut da astfel explicaţia

ştiinţifică a importanţei hibridării combinate cu sporirea numărului de cromosomi, în procesul natural de apariţie a noilor specii.

De asemenea, hibridarea a dus la descoperirea celor mai eficiente modalităţi de modificare a eredităţii în sensul dorit de om. Astfel, în ultimii ani s-a acordat o atenţie deosebită studiului mecanismului genetic al heterozisului şi s-au elaborat metode noi de obţinere a organismelor ce manifestă heterozis pe bază de linii consangvinizate.

Ameliorarea peştilor, înţeleasă ca proces de modificare a potenţialului productiv, a caracterelor ereditare, a genofondului populaţiilor în direcţia dorită de om, este o preocupare mai recentă. Selecţia şi creşterea formelor de peşti ameliorate, în scopul producerii de puiet şi a loturilor de reproducători cu calităţi superioare, reprezintă una dintre problemele majore ale cercetării şi producţiei piscicole.

Baza ereditară a individului, totalitatea genelor diseminate în nucleele tuturor celulelor din corpul său şi care îi controlează morfogeneza şi funcţionarea organismului pe tot parcursul vieţii este, deocamdată, imposibil de a fi dirijată după formarea zigotului. Singura soluţie practică de a crea o bază ereditară dorită este aceea de a interveni în procesul formării zigotului, al reproducerii; o modificare în acest moment se referă însă la populaţie, nu la individ, se modifică generaţia următoare şi nu cea actuală. Cu fiecare generaţie nouă sunt posibile schimbări genetice şi este bine ca acestea să fie dirijate şi nu lăsate în voia hazardului.

În ultimele decenii cercetarea legată de creşterea animalelor a fost confruntată cu o multitudine de solicitări exprese impuse de necesitatea adaptării tehnologiilor de creştere şi ameliorare la nevoia de a produce mai mult, mai bun şi mai ieftin (Granciu *et al.*, 1973). Ritmul dezvoltării şi industrializării creşterii animalelor reclamă introducerea în practică a unor metode moderne de investigaţie a potenţialului productiv, reproductiv şi a stării de sănătate a efectivelor existente şi ameliorarea acestora într-un timp scurt.

Selecţia practicată după schema clasică începe să fie depăşită atât sub raportul mijloacelor de investigaţie folosit, cât şi în raport cu factorul timp. Metodele clasice de apreciere a valorii de ameliorare a unui reproducător necesită timp îndelungat, de la naştere şi până când intră în producţie primii săi descendenţi. Practica ameliorării cere o metodă rapidă de selecţie, aşadar cât mai economică, pentru a permite o preselecţie a animalelor la o vârstă tânără, urmând ca ulterior să fie folosit şi alte criterii de selecţie.

Dezvoltarea metodelor de investigaţie biochimică şi progresele realizate de genetică au determinat orientarea cercetării ştiinţifice în direcţia descifrării

intimităţilor procesului metabolic, în special al sistemelor biochimice care îl compun (Cazacu, 1971). Acumularea datelor din acest domeniu ştiinţific a condus totodată la naşterea uneia dintre cele mai noi discipline biologice – genetica biochimică, disciplină de graniţă care înmănunchează tehnici de investigaţie şi concepte operaţionale din domeniul biochimiei, geneticii, biofizicii, fiziologiei.

Progresele înregistrate au contribuit la conturarea unor noi concepţii şi puncte de vedere în abordarea şi investigarea proceselor biologice. În acest context, problematica majoră a biochimiei se circumscrie unor aspecte fundamentale cum sunt studiul biomoleculelor, pe de o parte, şi studiul biochimic al sistemelor biologice, pe de alta. Obiectivele esenţiale care derivă din aceste aspecte se referă la organizarea biochimică a organismelor vii sub aspectul structurii, funcţiei şi proprietăţii biomoleculelor, la natura şi mecanismele reacţiilor biocatalitice asociate structurii celulare şi infracelulare, la procesele biochimice ale metabolismului, la reglarea şi controlul biochimic al activităţii celulare, la bazele moleculare ale proceselor biologice moleculare şi patologice (Dumitru, 1980; Tămaş *et al.*, 1981).

În ultimele decenii, cercetările s-au orientat tot mai pregnant în direcţia studiului amănunţit al metabolismului, în special al sistemelor biochimice care stau la baza lui, pornindu-se de la ideea că nivelul la care se desfăşoară procesele biochimice, influenţează în mod direct capacitatea productivă, reproductivă, de adaptare la mediu sau starea de sănătate a animalelor (Cazacu, 1971). Desigur, este puţin probabil că se va putea izola o anumită genă care determină un proces fiziologic complex. Este însă posibil ca printr-o serie de metode biochimice, genetice sau imunoserologice să se identifice aşa-numitele „gene markeri" şi să se urmărească evoluţia lor în cursul selecţiei şi, de asemenea, să se stabilească în ce măsură sunt sau nu corelate cu unele caractere cantitative şi calitative importante din punct de vedere economic (Kirpicinicov, 1987; Paaver, 1983).

Caracteristicile biochimice ale animalelor de fermă sunt folosit pentru studierea şi aprofundarea unui număr de probleme teoretice ca şi pentru rezolvarea unor aspecte practice legate de creşterea, ameliorarea, adaptarea şi sănătatea animalelor. Privite din acest punct de vedere, sistemele biochimice reprezintă un exemplu elocvent de cum un domeniu considerat o cercetare teoretică fundamentală exclusivă a putut să se implice în ameliorarea şi selecţia peştilor şi să-şi dovedească aplicabilitatea.

Pentru genetica biochimică şi implicit pentru practica ameliorării şi selecţiei peştilor sistemele biochimice prezintă importanţă prin polimorfismul lor, adică prin existenţa mai multor forme distincte ale fiecărui sistem în parte (Bănărescu,

1975, Maximilian, 1984). Polimorfismul se manifestă de la naştere şi, cu unele excepţii, constând în virarea către monomorfism ca urmare a eliminării unor alele sub influenţa factorilor de mediu combinată cu cea a factorilor tehnologici, se menţine constant tot timpul vieţii. De aici rezultă şi posibilitatea folosirii lui ca un instrument de selecţie timpurie a reproducătorilor de mare valoare. Avantajul de selecţie conferit de un tip sau altul din cadrul unui sistem biochimic este suficient ca să atragă atenţia asupra sa, în dependenţă cu formele sale de manifestare.

Ţinând seama de faptul că peştii reprezintă clasa de vertebrate superioare aflată pe treapta cea mai de jos a evoluţiei acesteia, că din punct de vedere anatomic şi fiziologic sistemele lor de organe sunt încă primitive, abia anunţând evoluţia din treaptă în treaptă şi înalta specializare de la mamifere, trebuie să acceptăm ideea că şi metabolismul lor şi, implicit, sistemele biochimice care compun acest metabolism se caracterizează prin aceleaşi trăsături. Dacă adăugăm la acestea faptul că fecundaţia externă şi oviparitatea este regula, iar viviparitatea excepţia, că dezvoltarea de la larvă la adult este, în general, caracteristică unor specii sau unui grup restrâns de specii, în timp ce altele nu trec prin stadiul de larvă (peştii vivipari), că unele specii de peşti reprezintă din punct de vedere evolutiv adevărate „puncte terminus" şi nu în ultimul rând numărul impresionant de specii, ne vom putea explica marea diversitate a situaţiilor şi aparentele paradoxuri faţă de cunoştinţele acumulate în diferitele domenii ale ihtiologiei.

Chen *et al.* (1984) au furnizat prima analiză cladistică clară a interrelaţiilor din cadrul familiei *Cyprinidae*. Cavender şi Coburn (1992) au reanalizat datele furnizate de Chen şi colaboratorii în 1984 şi au prezentat cea mai completă analiză filogenetică a familiei *Cyprinidae* din acea perioadă. În analiza lor asupra relaţiilor filogenetice asupra ciprinidelor din America de Nord, Cavender şi Coburn (1992) au concluzionat existenţa a două subfamilii: *Cyprininae*, care conţine barbinele, ciprininele şi labeoninele, şi *Leuscinae*, care include ticine, gobionine, rasborine, leuciscine, cultrine, xenocyprine, acheilognathine şi phoxinine. Totuşi, în ciuda acestor eforturi, interpretarea datelor morfologice s-a dovedit a fi dificilă. Verigile lipsă ale caracterelor morfologice valide care definesc diferite grupe sistematice au condus la stabilirea unor direcţii sistematice în cadrul familiei *Cyprinidae* (Nelson, 1994; Fink şi Fink, 1996).

Recent, s-au introdus alozime drept markeri pentru studiul proceselor de hibridare, structura populaţiilor şi relaţiilor filogenetice de nivel taxonomic mai mic în cadrul ciprinidelor europene (Coelho, 1992; Berrebi *et al.*, 1995; Coelho *et al.*, 1995; Karakousis *et al.*, 1995; Carmona *et al.*, 1997; Alves *et al.*, 1997a).

Cu toate acestea, aprecierea relaţiilor filogenetice la nivele taxonomice superioare necesită utilizarea de markeri moleculari diferiţi. Din acest punct de vedere, secvenţierea ADN în scopul analizării principalelor linii filogenetice ale ciprinidelor este pe deplin necesară (Berrebi *et al.*, 1996).

Distribuţia mare a ciprinidelor duce la apariţia unor întrebări de ordin biogeografic şi evoluţionist referitoare la evoluţia şi radiaţia viitoare a acestor specii. De exemplu, ciprinidele din interiorul Europei prezintă un interes particular în ce priveşte distribuţia cu numeroase specii endemice în Peninsula Iberică şi sudul Greciei şi genuri cu destul de puţine specii în centrul Europei (Bănărescu, 1973). Această distribuţie caracteristică a fost explicată prin izolarea Peninsulei Iberice şi a sudului Greciei de restul continentului, fapt ce a condus la limitarea numărului genurilor capabile să colonizeze ambele regiuni. Oricum, scenariul exact care a condus la actuala distribuţie biogeografică nu este încă stabilit. Unele dintre cele mai vechi ciprinide fosile au fost descoperite în straturile din Oligocen din Europa Centrală (Obrhelova, 1971), dar este general acceptat că ciprinidele din Europa au origine asiatică (Bănărescu, 1989, 1992). Dispersia ciprinidelor asiatice în Europa a fost posibilă numai în timpul Oligocenului (Bănărescu, 1989), a început odată cu formarea Munţilor Urali (Rögl şi Steininger, 1983), desfăşurându-se în paralel cu formarea acestora. Este încă neclar dacă întreaga Europă a fost colonizată în timpul migraţiei ce traversa Uralii în formare sau dacă unele ciprinide (în special genul *Barbus*) au ajuns în Peninsula Iberică prin nordul Africii (Doadrio, 1990; Zardoya şi Doadrio, 1998).

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

SCOPUL CERCETĂRILOR

După cum am precizat în capitolul introductiv, peştii reprezintă un important şi interesant material de studiu, datorită ratei crescute a reproducerii şi a prolificităţii (număr foarte mare de descendenţi), calităţi care le conferă un loc aparte în studiile de genetică populaţională. Totodată, în clasa *PISCES* există numeroase specii cu importanţă economică, fapt ce ne-a determinat să o alegem pentru prezentele investigaţii, în încercarea de a descifra argumente de ordin molecular, pentru filiaţie şi pentru eventuale acţiuni de selecţie şi ameliorare.

Un prim obiectiv al prezentei teze a constat în stabilirea cantităţii de ADN, atât în funcţie de ţesut (la acelaşi individ), cât şi în funcţie de individ (aceeaşi analiză a vizat indivizi diferiţi) şi specie (*Carassius auratus gibelio* Bloch. şi *Cyprinus carpio* L.). Probele supuse analizei au fost prelevate din două populaţii: Larga-Jijia – Movileni şi Iaşi.

Astfel, s-a urmărit cuantificarea cantităţii de ADN pentru cinci tipuri de ţesut (branhial, hepatic, muscular, renal şi splenic) şi au fost stabilite intervalele de variabilitate ale acestui parametru, pentru fiecare ţesut şi specie. De asemenea, au fost urmărite diferenţele existente între speciile „sălbatice" şi hibrizi ai acestora, prin prisma cantităţii (conţinutului) de ADN.

Trebuie menţionat că pentru stabilirea cantităţii de ADN au fost necesare verificări ale omogenităţii loturilor luate în studiu, pentru a exclude influenţa diferiţilor factori care ar putea induce modificări ale concentraţiei de ADN. Verificarea omogenităţii loturilor s-a realizat prin determinarea unor parametri şi indici fenotipici.

Un alt obiectiv al tezei l-a constituit secvenţierea a trei gene (care codifică sinteza citocromului b, a subunităţii 4L a dehidrogenazei, precum şi d-loop) din structura ADN mitocondrial, cu stabilirea diferenţelor existente între indivizii aceleiaşi populaţii şi între indivizi aparţinând la populaţii diferite, precum şi descrierea eventualelor haplotipuri.

În final, pe baza secvenţelor obţinute, au fost sugerate direcţiile evolutive probabile, pentru speciile celor două genuri.

BCU IAŞI - CENTRUL UNIVERSITAR LIBRARY

CAPITOLUL 1

CARACTERIZAREA BIOLOGICĂ A REPREZENTANȚILOR FAMILIEI *CYPRINIDAE*

1.1. ÎNCADRAREA SISTEMATICĂ

Cordatele sunt animale celomate, deuterostome, cu simetrie bilaterală. Ele se deosebesc de nevertebrate atât prin morfologia, cât şi prin structura mai complexă.

Spre deosebire de nevertebrate, care au exoschelet, la cordate corpul este susținut de un schelet axial intern, endoschelet, reprezentat prin notocord de origine dublă, endoblastică şi mezoblastică. Notocordul este situat deasupra tubului digestiv şi sub tubul neural. La vertebrate, în jurul notocordului se dezvoltă scheletul axial: coloana vertebrală şi craniul.

După locul pe care îl ocupă scheletul intern, cât şi după gradul lui de dezvoltare, cordatele se împart în trei încrengături: *Urochordata, Acrania şi Vertebrata.*

ÎNCRENGĂTURA *VERTEBRATA (CRANIATA)*

În comparație cu cordatele inferioare, încrengătura vertebrate cuprinde animale mult mai perfecționate atât în privința organizării, cât şi a caracterului de interrelație cu mediul.

În timp ce cordatele inferioare duc o viață sedentară sau fac deplasări mai mult sau mai puțin pasive, în limite mici şi se hrănesc pasiv, vertebratele se deplasează activ la distanțe mari, îşi caută şi îşi prind hrana, deci se hrănesc activ. Corespunzător acestui fel de viață, vertebratele au următoarele caractere morfologice:

Ca rezultat al modului activ de viață, apar organe de simț din ce în ce mai perfecționate. Pentru deplasare activă sunt folosit membrele, organe de locomoție. Ca urmare a unei hrăniri active, apare şi se dezvoltă un aparat bucal complex, reprezentat la marea majoritate a vertebratelor prin maxilare.

În lungul şi în jurul notocordului se formează coloana vertebrală. Ea se dezvoltă pe seama unui țesut mezodermic scheletogen. Pe partea dorsală a

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

coloanei vertebrale şi în lungul său se află axul neural situat într-un canal format din nişte arcade cartilaginoase sau osoase fixate câte una de fiecare vertebră. Acestea se numesc arcade neurale iar canalul respectiv, canal neural. Prin dezvoltarea vezicii neurale şi formarea encefalului, se dezvoltă şi un schelet de protecţie a lui, diferenţiindu-se astfel craniul (de aici numele de *Craniata).*

Fiind animale active, mobile, creşte şi activitatea lor vitală. Ca urmare, se dezvoltă inima, organul propulsor al sângelui care îi accelerează circulaţia. Prin mărirea activităţii vitale se măresc şi arderile. Aceasta a dus la dezvoltarea aparatului excretor sub formă de rinichi. Glandele endocrine sunt bine dezvoltate.

După lipsa sau prezenţa fălcilor, vertebratele se împart în două subîncrengături: *Agnatha* (fără fălci) şi *Gnathostomata* (cu fălci). (Figura 1).

SUBÎNCRENGĂTURA *GNATHOSTOMATA*

Cuprinde cordate a căror gură este prevăzută cu fălci şi dinţi osoşi, care le permite să prindă, să sfâşie sau să mestece hrana. Au membre perechi, iar peştii şi unele cetacee posedă şi membre neperechi. La formele acvatice, membrele sunt transformate în înotătoare. Endoscheletul este cartilaginos sau osos. Au doi saci nazali (amfirinie), urechea internă cu trei canale semicirculare, iar craniul are şi regiunea occipitală. *Subîncrengătura Gnathostomata* cuprinde supraclasa *Pisces* şi supraclasa *Tetrapoda.*

SUPRACLASA *PISCES*

Peştii sunt vertebratele gnatostomate cele mai primitive, poikiloterme, exclusiv acvatice, ce respiră prin branhii, au schelet cartilaginos sau osos şi prezintă înotătoare perechi şi neperechi.

Corpul, de formă hidrodinamică, în general fusiform, poate fi turtit lateral sau dorso-ventral. Falca superioară (maxilarul) poate fi mai scurtă, egală sau mai lungă decât falca inferioară (mandibula). Pe fiecare falcă pot exista prelungiri tegumentare numite mustăţi. În cavitatea bucală se găsesc dinţi osoşi maxilari, fixaţi pe falca superioară, dinţi mandibulari, pe falca inferioară, dinţi palatini pe oasele palatine şi dinţi vomerieni pe osul vomer.

Tegumentul acoperă corpul, fiind format din epidermă şi dermă. Pielea este foarte alunecoasă datorită mucusului secretat de celulele glandulare tegumentare.

BCU IAŞI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Corpul este, în general, acoperit cu solzi protectori de diferite tipuri sau cu plăci osoase de origine dermică. La selacieni, solzii au aspectul unor plăci bazale rombice sau rotunde, prevăzute cu un denticul spiniform care are structura unui dinte de mamifer. Vârful denticulului este îndreptat înapoi. Acest tip de solz se numeşte placoid. La teleosteeni, solzii sunt în general subțiri şi elastici. Ei sunt de două feluri: cicloizi şi ctenoizi. Solzii cicloizi au un contur circular şi suprafața netedă *(Salmo, Cyprinus* etc.*)*.

Pe fiecare latură a corpului, în apropierea zonei mijlocii, există câte un canal ce porneşte de la cap şi se întinde până în regiunea caudală. Acestea comunică cu exteriorul pe toată lungimea, iar în interior se găsesc o serie de organe senzoriale. Canalele şi organele senzoriale formează linia laterală, cu care peştii percep temperatura, salinitatea şi curenții de apă.

Organele de locomoție sunt reprezentate prin înotătoare perechi şi neperechi. În general, înotătoarele perechi sunt în număr de 4, două pectorale şi două ventrale. Cele pectorale sunt situate pe laturile corpului, în vecinătatea branhiilor, iar cele ventrale mai înapoi, la o distanță mai mică sau mai mare. La unele specii ele sunt plasate în regiunea abdominală, numite înotătoare abdominale *(Cyprinus, Salmo, Barbus* etc.*)*.

Inima peştilor este constituită din două camere, un ventricul şi un auricul; ea este aşezată ventral, imediat înapoia branhiilor. Sângele este roşu, hemoglobina găsindu-se în eritrocite, şi circulă printr-un sistem de vase închise. Circulația este simplă.

La peştii adulți, organul excretor este mezonefros, iar în stadiul embrionar, pronefros.

Reproducerea are loc în mediul acvatic, iar fecundația, în general, este externă.

După natura scheletului *supraclasa Pisces* se divide în două clase: *Chondrichtyes* şi *Osteichthyes*.

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

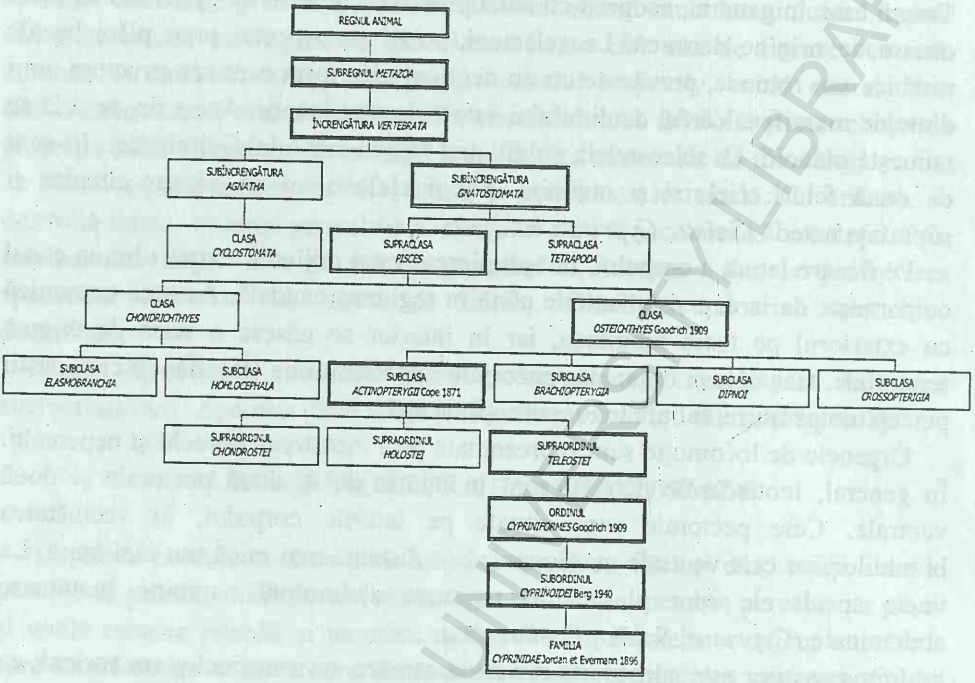


Figura 1. Încadrarea sistematică a familiei *Cyprinidae*

CLASA *OSTEICHTHYES*

În *clasa Osteichthyes* sunt cuprinşi peşti cu scheletul parţial sau total osificat, branhii în formă de pieptene, aşezate într-o cameră de fiecare latură a capului, acoperite cu un opercul. Corpul este acoperit cu solzi osoşi, lamelari. La majoritatea acestor peşti există vezică înotătoare situată dorsal faţă de tubul digestiv.

Clasa Osteichthyes cuprinde circa 20.000 de specii grupate în următoarele subclase: *Actinopterygia, Brachiopterygia, Dipnoi şi Crossopterygia.*

BCU IAŞI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

SUBCLASA *ACTINOPTERYGIA*

Grupează peşti ale căror înotătoare perechi sunt adaptate la înot. Ele au baza lată (tip euribazal), nu sunt cărnoase şi nu proeminează cu un peduncul. Radiile sunt aşezate uniseriat şi au dispoziţie radială. Ea cuprinde majoritatea peştilor actuali care au fost grupaţi în trei supraordine: *Chondrostei, Holostei şi Teleostei.*

SUPRAORDINUL *TELEOSTEI*

Cuprinde cei mai evoluaţi peşti, având scheletul complet osificat. Corpul este acoperit cu solzi cicloizi şi ctenoizi, înotătoarea caudală homocercă iar vezica înotătoare necompartimentată. Acest supraordin cuprinde 90% din peştii actuali.

ORDINUL *CYPRINIFORMES* (Goodrich, 1909)
(*Ostariophysi* – Sagemehl, 1885)

Cuprinde peşti fizostomi, având aparatul lui Weber în legătură cu vezica înotătoare şi cu urechea internă. Corpul este acoperit cu solzi cicloizi, iar înotătoarele perechi, dorsală şi anală, au radiile moi, exceptând primele 2 – 3 care au formă de spini; ventralele au o poziţie abdominală (foarte rar lipsesc).

Cuprinde 4 subordine – *Characoidei, Cyprinoidei, Gymnotoidei* şi *Siluroidei.*

SUBORDINUL *CYPRINOIDEI* (Berg, 1940)
(*Eventognathi* – Jordan, 1923; *Cypriniformes* – Regan, 1911)

Oasele gurii sunt lipsit de dinţi. Dorsala totdeauna prezentă; aripioara adipoasă lipseşte. Oasele faringiene inferioare falciforme, paralele cu arcurile branhiale. Craniul platibazic, cavitatea craniană ce se întinde înaintea orbitelor. Parietalele late, distincte. Primele patru vertebre contribuie la formarea aparatului lui Weber.

Se întâlnesc în apele dulci ale întregii Asii, Europa, Africa, America de Nord şi Centrală. Centrul genetic a fost probabil Asia de sud-est. Centrele puternice de diferenţiere au fost: Asia sudică, Asia estică, Asia Centrală, Siberia şi estul Americii de Nord. Europa are o faună de ciprinoide în parte de origine siberiană şi nord-americană, în parte est-asiatică, în parte vest-asiatică.

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

FAMILIA *CYPRINIDAE* (Jordan & Evermann, 1896)
(*Cyprinidae* – Günther, 1868)

Corpul are formă variabilă, acoperit cu solzi cicloizi, rar nud. Linia laterală completă sau incompletă. Dorsala şi anala, de lungime foarte variabilă, au 2 – 4 radii simple, dintre care doar ultimul de lungimea radiilor divizate; el este uneori subţire, alteori osificat. Marginea fălcilor superioare este formată exclusiv din intermaxilare. Oasele gurii fără dinţi. Oasele faringiene bine dezvoltate, falciforme, prevăzute cu dinţi dispuşi pe 1 – 3 rânduri, de formă foarte variabilă. Gura lipsită de mustăţi sau cu cel mult două perechi de mustăţi.

Ventralele cu două radii simple şi 5 – 8 radii divizate. Pectoralele cu o radie simplă şi 13 – 17 divizate. Caudala totdeauna scobită. Vezica cu aer totdeauna prezentă, obişnuit mare, rar (la unele genuri est-asiatice înrudite cu *Gobio*) este redusă şi învelită într-o capsulă osoasă.

Cuprinde peste 200 genuri şi circa 2.000 specii. Genurile se grupează în zece subfamilii imprecis delimitate. În subregiunea euromediteraneană trăiesc 33 de genuri, dintre care doar 20 sunt prezente în bazinul Dunării.

1.1.1. LISTA DE SPECII

1. Genul *Rutilus* Rafinesque 1820
   1.1. Subgenul *Rutilus* Rafinesque 1820
      1.1.1. *Rutilus* (s. str.) *rutilus* Linnaeus 1758
         1.1.1.1.1. *Rutilus rutilus carpathorossicus* Vladikov 1930
         1.1.1.1.2. *Rutilus rutilus heckeli* Nordmann 1840
   1.2. Subregnul *Pararutilus* Berg 1912
      1.2.1. *Rutilus (Pararutilus) frisii* Nordmann 1840
         1.2.1.1. *Rutilus frisii frisii* Nordmann 1840
2. Genul *Leuciscus* Cuvier 1817
   2.1. Subregnul *Telestes* Bonaparte 1837
      2.1.1. *Leuciscus (Telestes) souffia* Risso 1826
         2.1.1.1. *Leuciscus souffia agassizi* Valenciennes 1844
   2.2. Subregnul *Leuciscus* Cuvier 1817
      2.2.1. *Leuciscus* (s. str.) *leuciscus* Linnaeus 1758
         2.2.1.1. *Leuciscus leuciscus leuciscus* Linnaeus 1758
   2.3. Subgenul *Squalius* Bonaparte 1841
      2.3.1. *Leuciscus (Squalius) cephalus* Linnaeus 1758
         2.3.1.1. *Leuciscus cephalus cephalus* Linnaeus 1758
      2.3.2. *Leuciscus (Squalius) borysthenicus* Kessler 1859
         2.3.2.1. *Leuciscus borysthenicus borysthenicus* Kessler 1859

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

2.4. Subgenul *Idus* Heckel 1758
2.4.1. *Leuciscus (Idus) idus* Linnaeus 1758
2.4.1.1. *Leuciscus idus idus* Linnaeus 1758
3. Genul *Phoxinus* Rafinesque 1820
3.1.1. *Phoxinus phoxinus* Linnaeus 1758
3.1.1.1. *Phoxinus phoxinus phoxinus* Linnaeus 1758
4. Genul *Tinca* Cuvier 1817
4.1.1. *Tinca tinca* Linnaeus 1758
5. Genul *Scardinius* Bonaparte 1837
5.1.1. *Scardinius erythrophthalmus* Linnaeus 1758
5.1.1.1. *Scardinius erythrophthalmus erythrophthalmus* Linnaeus 1758
5.1.1.2. *Scardinius erythrophthalmus racovitzai* G. Müller 1958
6. Genul *Aspius* Agassiz 1835
6.1.1. *Aspius aspius* Linnaeus 1758
6.1.1.1. *Aspius aspius aspius* Linnaeus 1758
7. Genul *Leucaspius* Heckel und Kner 1858
7.1.1. *Leucaspius delineatus* Heckel 1843
7.1.1.1. *Leucaspius delineatus delineatus* Heckel 1843
8. Genul *Chalcalburnus* Berg 1933
8.1.1. *Chalcalburnus chalcoides* Güldenstaedt 1772
8.1.1.1.*Chalcalburnus chalcoides mento* Agassiz 1832
9. Genul *Alburnus* Heckel 1843
9.1.1. *Alburnus alburnus* Linnaeus 1758
9.1.1.1. *Alburnus alburnus alburnus* Linnaeus 1758
10. Genul *Alburnoides* Jeitteles 1861
10.1.1. *Alburnoides bipunctatus* Bloch 1782
10.1.1.1. *Alburnoides bipunctatus bipunctatus* Bloch 1782
11. Genul *Blicca* Heckel 1843
11.1.1. *Blicca bjoerkna* Linnaeus 1758
11.1.1.1. *Blicca bjoerkna bjoerkna* Linnaeus 1758
12. Genul *Abramis* Cuvier 1817
12.1.1. *Abramis brama* Linnaeus 1758
12.1.1.1. *Abramis brama danubii* Pavlov 1956
12.1.2. *Abramis sapa* Pallas 1811
12.1.2.1. *Abramis sapa sapa* Pallas 1811
12.1.3. *Abramis ballerus* Linnaeus 1758
13. Genul *Vimba* Fitzinger 1879
13.1.1. *Vimba vimba* Linnaeus 1758
13.1.1.1. *Vimba vimba carinata* Pallas 1811

BCU LIBRARY

14. Genul *Pelecus* Agassiz 1835
    14.1.1. *Pelecus cultratus* Linnaeus 1758
15. Genul *Chondrostoma* Agassiz 1835
    15.1.1. *Chondrostoma nasus* Linnaeus 1758
        15.1.1.1. *Chondrostoma nasus nasus* Linnaeus 1758
16. Genul *Rhodeus* Agassiz 1835
    16.1.1. *Rhodeus sericeus* Pallas 1776
        16.1.1.1. *Rhodeus sericeus amarus* Bloch 1782
17. Genul *Gobio* Cuvier 1817
    17.1. Subgenul *Gobio* Cuvier 1817
        17.1.1. *Gobio* (s. str.)*gobio* Linnaeus 1758
            17.1.1.1. *Gobio gobio obtusirostris* Valenciennes 1844
    17.2. Subgenul *Rheogobio* Bănărescu 1961
        17.2.1. *Gobio (Rheogobio) uranoscopus* Agassiz 1828
            17.2.1.1. *Gobio uranoscopus friči* Vladykov 1925
    17.3. Subgenul *Romanogobio* Bănărescu 1961
        17.3.1. *Gobio (Romanogobio) albipinnatus* Lukasch 1933
            17.3.1.1. *Gobio albipinnatus vladykovi* Fang 1943
        17.3.2. *Gobio (Romanogobio) kessleri* Dybowski 1862
            17.3.2.1.*Gobio kessleri banaticus* Bănărescu 1953
            17.3.2.2. *Gobio kessleri antipal* Bănărescu 1953
18. Genul *Pseudorasbora* Bleeker 1860
    18.1.1. *Pseudorasbora parva* Schlegel 1842
19. Genul *Barbus* Cuvier 1817
        19.1.1.*Barbus barbus* Linnaeus 1758
            19.1.1.1.*Barbus barbus barbus* Linnaeus 1758
        19.1.2. *Barbus meridionalis* Risso 1826
            19.1.2.1. *Barbus meridionalis petenyi* Heckel 1847
20. **Genul *Cyprinus* Linnaeus 1758**
    20.1.1. ***Cyprinus carpio* Linnaeus 1758**
        20.1.1.1. ***Cyprinus carpio carpio* Linnaeus 1758**
21. **Genul *Carassius* Jarocki 1822**
    21.1. ***Carassius carassius* Linnaeus 1758** (Vostradovsky 1973)
    21.2. *Carassius auratus* Linnaeus 1758
        21.2.1. *Carassius auratus auratus* Linnaeus 1758
        21.2.2. *Carassius gibelio* Bloch 1783
        21.2.3. *Carassius auratus langsdorfii* Temminck & Schlegel, 1846
        21.2.4. *Carassius auratus buergeri* Temminck & Schlegel, 1846
        21.2.5. *Carassius auratus grandoculis* Temminck & Schlegel, 1846
    21.3. *Carassius cuvieri* Temminck & Schlegel, 1846 (Shen, 1993)

BCU CLUJ / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Cu litere îngroşate, sunt evidenţiate speciile şi subspeciile genurilor *Cyprinus* şi *Carassius* care au constituit obiectul de studiu al prezentei teze şi cele ale căror secvenţe au fost preluate din banca de gene, pentru comparaţie (*Carassius auratus langsdörfii* GenBank Ref. Nr. AB006953, *Carassius carassius* GenBank Ref. Nr. AY714387, *Carassius cuvieri* GenBank Ref. Nr. AB045144).

1.1.2. HIBRIZI INTERSPECIFICI DE CIPRINIDE

1. *Rutilus rutilus carpathorossicus* x *Alburnus alburnus alburnus*
2. *Rutilus rutilus carpathorossicus* x *Blicca bjoerkna bjoerkna*
3. *Rutilus rutilus carpathorossicus* x *Abramis brama danubii*
4. *Leuciscus cephalus cephalus* x *Alburnus alburnus alburnus*
5. *Scardinius erythrophthalmus erythrophthalmus* x *Blicca bjoerkna bjoerkna*
6. *Alburnus alburnus alburnus* x *Abramis brama danubii*
7. *Blicca bjoerkna bjoerkna* x *Abramis brama danubii*
8. *Cyprinus carpio carpio* x *Carassius carassius*
9. *Cyprinus carpio carpio* x *Carassius auratus auratus*
10. ***Carassius auratus* x *Cyprinus carpio***
11. ***Carassius auratus* x *Cyprinus carpio* x *Carassius cuvieri***

1.2. CARACTERIZAREA GENETICĂ A FAMILIEI *CYPRINIDAE*

Primele încercări de evidenţiere şi numărare a cromosomilor la peşti aparţin cercetătorilor Moore (1890), Van der Strict (1895) şi Sobota (1897) (citaţi de Taisescu, 1979), dar cercetările privind citogenetica şi filogenia peştilor aparţin secolului nostru şi s-au dezvoltat preponderent după 1960.

Ce ştim despre mecanismele eredităţii la peşti se bazează în principal pe cercetări efectuate pe foarte puţini membri ai ordinului *Cyprinodontiformes* – *Lebistes reticulatus*, *Xiphophorus sp.* şi specii mexicane ale genului *Poeciliopsis*. Mai nou, cunoştinţele în acest domeniu s-au lărgit odată cu efectuarea de cercetări pe crap şi caras (*Cyprinidae*), păstrăv (*Salmonidae*) şi alte specii reprezentative aparţinând la grupe diferite.

În ce priveşte determinismul sexelor, aproape toate tipurile de reproducere sexuată cunoscute la animale pot fi întâlnite la peşti. Oricum, mecanismul determinismului sexual la majoritatea peştilor osoşi nu este încă elucidat. Cromosomii sexului sunt atât de puţin diferenţiaţi faţă de autosomi, încât foarte rar pot fi evidenţiaţi. Se presupune că determinismul sexelor poate fi controlat, parţial dacă nu chiar complet, de gene dispersate în lungul autosomilor. Determinismul sexelor poate fi diferit la specii diferite, precum şi în cazul încrucişărilor, între masculi puternici şi femele debilitate, rezultatul fiind un sex-ratio neechilibrat, în favoarea masculilor.

Datele existente în legătură cu determinismul sexelor în populaţii sălbatice de peşti şi populaţii de laborator relevă mecanisme mai ample decât în cazul altor vertebrate. Pe când la mamifere femelele sunt homogametice (XX) şi masculii heterogametici (XY) şi la păsări tipul opus (femele, WY; masculi, YY), la peşti ambele mecanisme sunt prezente.

În ce priveşte numărul de cromosomi, ultimele cercetări arată că numărul diploid de cromosomi la peşti variază între 18 şi 104. Numărul cromosomilor determinat pe metafaze aparţinând diviziunii mitotice poate diferi radical pe parcursul diviziunilor repetate ale celulei-ou, deci în cadrul aceleiaşi specii şi al aceluiaşi individ.

Observaţiile asupra numărului de cromosomi la peşti sunt mult mai puţine faţă de oricare alt grup de animale. Creşterea interesului asupra numărului de cromosomi şi a morfologiei acestora promite importante contribuţii la fundamentarea anumitor teorii privind evoluţia şi filogenia peştilor.

Cunoaşterea unor elemente de genetică la crap prezintă o mare importanţă pentru acţiunile de ameliorare, datorită faptului că la un reproducător se obţine un număr foarte mare de descendenţi (de ordinul zecilor sau chiar sutelor de mii), iar particularităţile genetice trebuie cunoscute în amănunt.

Lucrările de selecţie sunt greu de abordat, deoarece fecundaţia, evoluţia embrionului şi a larvei, precum şi desfăşurarea proceselor de creştere şi de dezvoltare au loc în apă, unde urmărirea acestora este mai greoaie. Pe lângă aceasta, mediul de viaţă acvatic are o influenţă pregnantă asupra creşterii şi dezvoltării descendenţei, faţă de alte specii de animale (mai ales faţă de mamifere), toate acestea făcând ca rezultatele ameliorării să fie mai puţin spectaculoase.

Importanţa cunoaşterii elementelor genetice la crap este accentuată şi de manifestarea unor fenomene caracteristice, cum ar fi letalitatea totală (Stan şi Păsărin, 1996) întâlnită la indivizii homozigoţi de crap-oglindă, pentru a cărei înţelegere se dau următoarele explicaţii:

În primul rând, se apreciază că de învelişul solzos la crap sunt răspunzătoare două gene cu alelele lor şi anume:

- gena „S" şi alela sa „s" determină acoperirea totală a corpului cu solzi;
- gena „N" şi alela sa „n" determină neacoperirea cu solzi (sau tipul nud).

După unii autori, la crap se deosebesc 4 fenotipuri ale învelişului solzos şi anume:

- crap cu solzi pe toată suprafaţa corpului;
- crap cu solzi numai pe linia laterală;

- crap-oglindă (cu puțini solzi răspândiți neuniform, mai ales sub formă de ramă);
- crap golaș (fără solzi sau puțini solzi și răzleți);
- crap fără solzi;

Cu privire la transmiterea în descendență a tipului de înveliș solzos, se apreciază că aceasta depinde de schemele de încrucișare aplicate, respectiv de combinarea genelor răspunzătoare de însușirile respective.

Rezultatele încrucișării fenotipurilor de crap, în funcție de învelișul solzos, sunt conforme cu legile mendeliene. Așa de exemplu, prin încrucișarea indivizilor homozigoți de crapi cu solzi (cu genotipul SSnn) cu cei oglindă (cu genotipul ssnn) se obțin produși heterozigoți (cu genotipul Ssnn). Dacă acești indivizi sunt încrucișați în continuare cu indivizi de crap-oglindă (ssnn), se obțin produși cu genotipurile Ssnn (heterozigoți) și ssnn (homozigoți oglindă) (Figura 2).

Trebuie menționat că indivizii homozigoți de crap-oglindă cu genotipul NN, nu sunt viabili, deoarece sunt incompatibili cu procesele vitale (fenomenul de letalitate totală), așa cum se poate observa în Tabelul 1.

Tabel 1. Genotipurile caracteristice celor patru tipuri de crap

Specificare	Crap cu solzi	Crap-oglindă	Crap cu solzi în linie	Crap golaș
În celule somatice	1. SSnn 2. Ssnn	ssnn	1. SSNn 2. SsNn	ssNn
În gameți	1. numai Ss 2. Ss sau sn	numai sn	1. SSNn 2. SsNn	sN sau sn

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

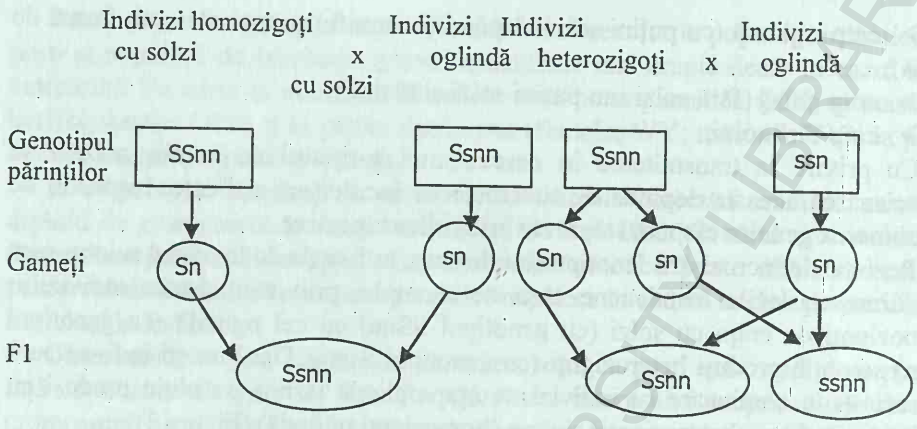


Figura 2. Rezultatele încrucişării crapului-oglindă cu crapul cu solzi (după Stan şi Păsărin, 1996)

În cadrul familiei *Cyprinidae* s-au identificat două categorii de specii – prima cu complementul diploid variind în jurul cifrei 100 (*Cyprinus carpio* 2n=100, *Carassius auratus* 2n=104) şi cealaltă cuprinzând specii cu 2n variind în jurul cifrei 50 (*Baarbus tetrazona* 2n=50, *Barbus fasciatus* 2n=52) (Minciu şi Băra, 1985).

În anul 1979, Taisescu a stabilit numărul diploid de cromosomi şi cariotipul la 10 specii de *Cyprinidae* (*Gobio gobio, Gobio uranoscopus, Gobio albipinnatus, Gobio kessleri, Pseudorasbora parva, Cyprinus carpio, Carassius carrasius, Carassius auratus, Scardinius erythrophthalmus şi Phoxinus phoxinus*), iar la specia *Gobio gobio* s-a întocmit idiograma.

Spre deosebire de alţi autori care raportează la *Carassius carassius* numărul diploid identic cu cel al speciei *Carassius auratus* (2n=94, 100, 102, 104), cercetările prezente (Taisescu, 1979), stabilesc la caracudă 2n=50 (Figura 3) iar la carasul auriu 2n=98. Deoarece în literatura de specialitate este citată foarte adesea legătura filogenetică între cele două specii, s-a încercat stabilirea unei relaţii în sens evolutiv între complementele lor cromosomiale (Figura 3).

BCU IAŞI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

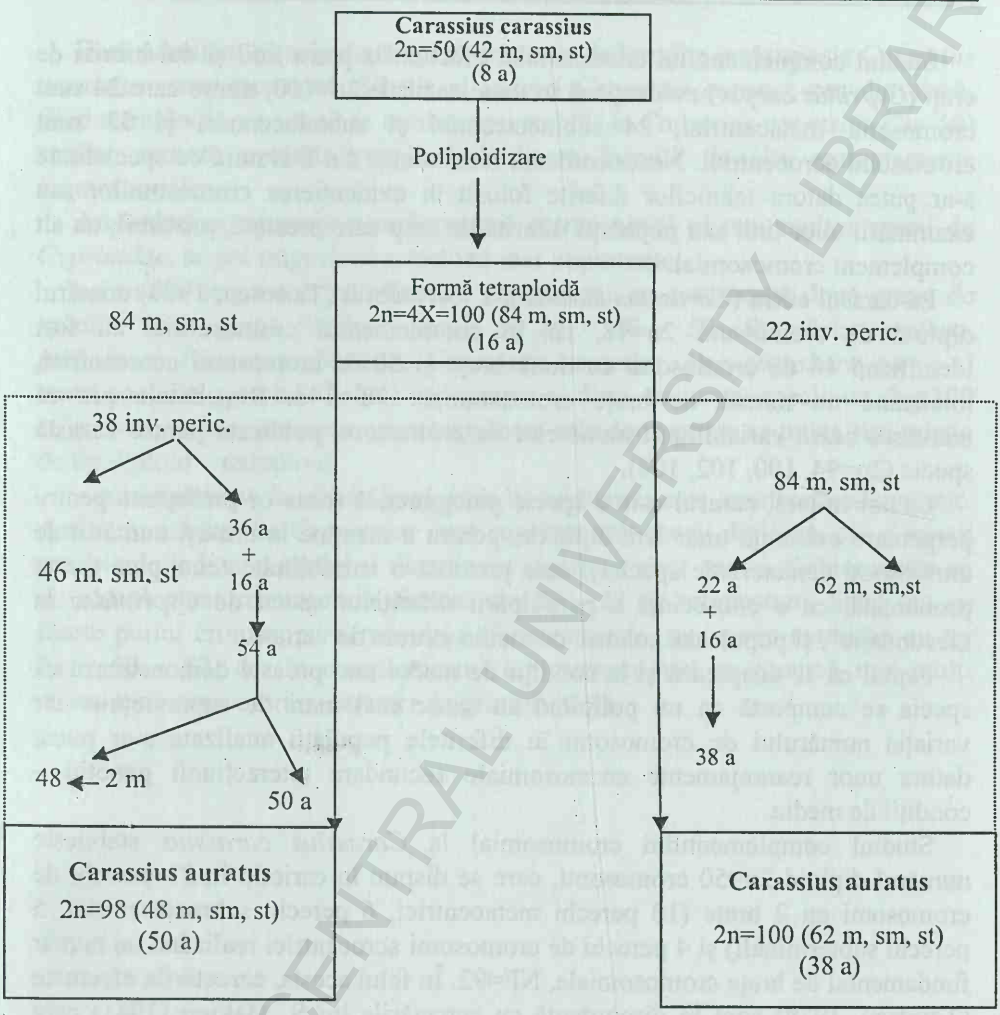


Figura 3. Schema probabilă a evoluției speciei *Carassius auratus* din specia *Carassius carassius* (după Taisescu, 1979)

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Studiul complementului cromosomial efectuat la patru linii şi doi hibrizi de crap (*Cyprinus carpio*) evidenţiază în toate cazurile 2n=100, dintre care 24 sunt cromosomi metacentrici, 24 submetacentici şi subtelocentrici şi 52 sunt cromosomi acrocentrici. Neconcordanţa rezultatelor din literatura de specialitate s-ar putea datora tehnicilor diferite folosit în evidenţierea cromosomilor sau examinării unor linii sau populaţii diferite de crap care prezintă, probabil, un alt complement cromosomial.

La carasul auriu (*Carassius auratus*), a fost stabilit (Taisescu, 1979) numărul diploid de cromosomi 2n=98, iar în complementul cromosomial au fost identificaţi 48 de cromosomi cu două braţe şi 50 de cromosomi acrocentrici, totalizând un număr de braţe cromosomiale NF=146. Rezultatele par să mărească scara variabilităţii numerelor de cromosomi publicate pentru această specie (2n=94, 100, 102, 104).

La noi în ţară, carasul este o specie ginogenetică (ceea ce presupune pentru perpetuare existenţa unor icre diploide, pentru a menţine la urmaşi numărul de cromosomi caracteristic speciei), care prezintă o variabilitate fenotipică foarte pronunţată, ca o consecinţă a participării diferitelor specii de *Cyprinidae* la „fecundaţie", şi populează condiţii de mediu extrem de variate.

Faptul că se adaptează şi la condiţii de mediu mai proaste demonstrează că specia se comportă ca un poliploid cu şanse mai mari de supravieţuire iar variaţia numărului de cromosomi în diferitele populaţii analizate s-ar putea datora unor rearanjamente cromosomiale secundare interacţiunii genotip – condiţii de mediu.

Studiul complementului cromosomial la *Carassius carassius* stabileşte numărul diploid 2n=50 cromosomi, care se dispun în cariotip în 21 perechi de cromosomi cu 2 braţe (10 perechi metacentrici, 6 perechi submetacentrici, 5 perechi subterminali) şi 4 perechi de cromosomi acrocentrici realizând un număr fundamental de braţe cromosomiale, NF=92. În felul acesta, cercetările efectuate (Taisescu, 1979) sunt în discordanţă cu cercetările lui S. Makino (1941) care raportează 2n=94 şi n=47, la fel ca şi la carasul auriu; cu cele ale lui H. Kobayasi (1977) care raportează 2n=94 fără să facă o descriere morfologică a complementului cromosomial şi cu cercetările lui U. Wolf *et al.* (1969), (citaţi de Taisescu, 1979), care raportează 2n = 100 – 104, afirmaţie neînsoţită de material ilustrativ sau descrierea morfologică a complementului cromosomial.

Este posibil ca autorii citaţi anterior să fi analizat citogenetic o rasă geografică de caras auriu (specie cu o variabilitate individuală remarcabilă) care, datorită condiţiilor din mediul pe care îl populează, se aseamănă foarte mult, ca morfologie externă, cu caracuda.

Dacă admitem că cele două specii sunt atât de înrudite încât specia *Carassius carassius* constituie tipul sălbatic al speciei *Carassius auratus*, cea din urmă, fiind tetraploidă, numărul de cromosomi stabilit la *Carassius carassius* (2n=50) susține această evoluție prin poliploidizare însoțită de alte rearanjamente cromosomiale.

Analizând comparativ complementul cromosomial al mai multor specii de *Cyprinidae*, se pot trage două concluzii mai importante:

– în ceea ce privește numărul de cromosomi, se conturează două grupe de specii. Prima grupă cuprinde specii cu 2n = 48 – 50 (*Scardinius erythrophthalmus, Phoxinus phoxinus, Carassius carassius, Pseudorasbora parva* și toate speciile genului *Gobio*) iar grupa a doua reunește specii cu 2n≅100 (*Cyprinus carpio, carassius auratus*); între cele două grupe ar putea fi o relație de tip diploid – tetraploid;

– subîmpărțirea familiei *Cyprinidae* în subfamilii este justificată citogenetic. Astfel, în subfamilia *Cyprininae* sunt cuprinse atât specii diploide, cât și specii tetraploide indicând modul și direcția de apariție a unor specii. Gobioninaele au un complement cromosomial format din 50 – 52 de cromosomi, lipsit sau cu foarte puțini cromosomi acrocentrici. Leuciscinaele, mai puțin evoluate, au tot 2n = 50 – 52, dar în complementul lor cromosomial se observă mai mulți cromosomi acrocentrici (caracter de primitivitate).

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

CAPITOLUL 2

GINOGENEZĂ ŞI HIBRIDARE ÎN CADRUL FAMILIEI *CYPRINIDAE*

2.1. TEHNOLOGIA OBŢINERII DESCENDENŢILOR GINOGENETICI DIPLOIZI LA *CYPRINUS CARPIO* L.

2.1.1. PROPRIETĂŢILE DESCENDENŢILOR GINOGENETICI

Sunt determinate de către mecanismul diploidizării setului de cromosomi aduşi de gameţii femeli. Icrele mature ale crapului (ca şi ale altor specii de peşti) se află în stadiul metafazei şi conţin un număr haploid de cromosomi. Cercetări mai amănunţite au stabilit că diploidizarea se realizează pe seama blocării celei de-a doua diviziuni meiotice. Un astfel de mecanism asigură o diferenţiere în descendenţa ginogenetică şi trecerea genei în stare homozigotă. Caracterul heterozigot se păstrează în cazul încrucişării între genă şi alelă. De aceea probabilitatea homozigotării este diferită la gene diferite. Există gene care în şirul generaţiilor ginogenetice succesive se menţin în stare heterozigotă (de exemplu, gena dominantă a acoperirii cu solzi „N"). În medie, coeficientul de încrucişare înrudită (inbreeding) reprezintă 0,6 la prima generaţie şi 0,8 – 0,9 la cea de-a doua şi a treia generaţie. Comparativ cu o astfel de încrucişare înrudită, ginogeneza asigură un câştig de timp aproape de patru ori. Prin urmare, în cadrul lucrărilor de selecţie, ginogeneza indusă îşi poate găsi aplicabilitatea în primul rând în legătură cu posibilitatea obţinerii mai rapide a indivizilor înalt homozigoţi. Liniile înalt homozigote prezintă interes în primul rând pentru încrucişările industriale în scopul obţinerii efectului de heterozis. Există o serie de alte domenii de utilizare a metodei în lucrările de selecţie şi în lucrările genetice: pentru estimarea gradului de depresie a încrucişării înrudite (inbreeding depression), analiza transmiterii ereditare a genelor recesive.

Cel de-al doilea domeniu posibil de utilizare practică a ginogenezei este utilizarea ei în scopul reglării raportului între sexe, în special pentru obţinerea unor descendenţe de un singur sex – numai femel.

BCU "VASILE ALECSANDRI" UNIVERSITY LIBRARY

2.1.2. TEHNOLOGIA OBŢINERII DESCENDENŢILOR GINOGENETICI DIPLOIZI

2.1.2.1. Pregătirea icrelor în vederea însămânţării

Descendenţa ginogenetică se obţine prin utilizarea şocurilor termice, cu rol de creştere a frecvenţei de diploidizare a cromosomilor femeli. Obţinerea spontană a indivizilor ginogenetici diploizi la descendenţele obţinute de la femele de ciprinide se face, cantitativ, într-o proporţie care reprezintă sutimi de procent din numărul icrelor fecundate. Şocul termic măreşte obţinerea diploizilor de zeci de ori. Mecanismul diploidizării este probabil, în ambele cazuri, identic.

Şocul termic se efectuează pe icrele nefecundate (etapa de metafază a meiozei) în decurs de 4 – 6 ore la temperatura de +7,5 – 9°C.

2.1.2.2. Inactivarea genetică a spermatozoizilor

Inactivarea genetică a spermatozoizilor (inactivarea cromosomilor masculi) se realizează prin iradierea materialului seminal cu radiaţii ionizante (raze Röentgen sau radiaţii ultraviolete), în doze ridicate (ginogeneza prin iradiere). Datorită acţiunii selective a acestor agenţi asupra cromosomilor, spermatozoidul iradiat îşi păstrează capacitatea de a pătrunde în oosferă, iar aparatul de diviziune al celulei (centrosomul) funcţionează normal.

Pentru inactivarea genetică a spermatozoizilor cu raze Röentgen se folosesc doze de 90 – 100 Curie. Este de dorit ca timpul de iradiere să nu depăşească 10 – 20 de minute, fapt care (pentru atingerea dozei sus menţionate) este posibil în cazul unei puteri a instalaţiei de 5 – 10 curie/minut. Iradierea se face în vase Petri din sticlă organică, ale căror dimensiuni depind de construcţia instalaţiei. De obicei sunt utilizate vase plate din sticlă organică cu diametrul de 19 mm şi înălţimea de 6 mm.

Mai comodă însă este folosirea radiaţiilor ultraviolete, deoarece utilizarea acestui inactivator nu necesită un aparataj complicat şi poate fi organizată uşor.

Drept sursă de raze ultraviolete servesc lămpile cu mercur – se foloseşte ultravioletul monocromatic la o lungime de undă cuprinsă între 254 milıı şi 265 milıı. Doza de iradiere fiind de 3000 ergi/mm^2. Durata de iradiere depinde de puterea lămpii, adică de numărul de ergi/mm^2/min.

Ţinând cont de faptul că razele ultraviolete au o putere de pătrundere slabă, pentru micşorarea concentraţiei spermatozoizilor supuşi radiaţiei, trebuie făcută în prealabil o diluţie cu soluţie Holtfreter cu concentraţia dublă a sărurilor (NaCl – 6,6g/l, $CaCl_2$ – 0,2g/l, KCl – 0,1g/l, $NaHCO_3$ – 0,4g/l).

Iradierea se face într-un vas Petri, în care 10 ml de suspensie formează un strat cu înălţimea de 1 – 1,5mm, care permite pătrunderea razelor ultraviolete

(UV). Vasul Petri cu suspensia de spermă se agită pe un agitator magnetic, montat sub lampă, pentru a omogeniza eventualele cheaguri şi pentru a asigura o amestecare uniformă a tuturor spermatozoizilor.

Timpul când se începe iradierea trebuie să coincidă cu momentul terminării şocului de frig, iar în cazul metodelor în care nu se foloseşte şocul de frig – cu momentul obţinerii icrelor curgătoare.

2.1.2.3. Obţinerea descendenţilor ginogenetici

Pentru obţinerea loturilor de masă ale descendenţelor ginogenetice primare este necesară aplicarea şocului de frig. Însămânţarea icrelor se efectuează imediat după terminarea acestuia. Pentru a ţine seama de influenţa răcirii asupra calităţii icrelor se ia un al doilea lot de control: însămânţarea icrelor (supuse şocului cu frig) cu material seminal normal, neiradiat.

Pentru obţinerea descendenţelor ginogenetice fără aplicarea şocului termic se efectuează însămânţarea icrelor proaspăt recoltate cu material seminal iradiat.

2.1.2.4. Stabilirea originii ginogenetice a peştilor

Respectarea tehnologiei de iradiere descrisă mai sus asigură inactivarea genetică a tuturor spermatozoizilor, iar descendenţa obişnuită constă numai din indivizi ginogenetici.

O confirmare directă a ginogenezei o dau rezultatele analizei ginogenetice cu ajutorul genelor marcatoare, adică al criteriilor „mendelizante" strict transmisibile prin ereditate. În Tabelul 2 sunt redate exemple ale câtorva încrucişări de acest fel. În cazul în care drept marcator se foloseşte un criteriu dominant (o caracteristică dominantă) (de exemplu acoperământul cu solzi, Tabelul 2, încrucişarea 1), este necesar să se folosească materialul seminal iradiat al masculilor homozigoţi cu solzi. Această condiţie nu mai este necesară în cazul marcatorilor cu caracter codominant al moştenirii (de exemplu, transferinele, Tabelul 2, încrucişarea 3). O valoare deosebită prezintă caracteristicile care se manifestă în etapele timpurii. De exemplu, la crap, este descrisă o caracteristică (lipsa pigmentaţiei embrionilor) cu ajutorul căreia se poate efectua analiza chiar şi pe embrionii abia eclozaţi (Tabelul 2, încrucişarea 2). Folosirea caracteristicilor care se manifestă de timpuriu este deosebit de importantă pentru toate cazurile în care nu există o experienţă vastă de obţinere a descendenţelor ginogenetice şi nu există o certitudine deplină în ceea ce priveşte calitatea iradierii.

Dovezile indirecte ale inactivării cromosomilor masculi pot fi obţinute prin rezultatele analizei patologice şi ale analizei embriologice.

BCU CLUJ / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Tabel 2. Exemple de încrucişări efectuate pentru verificarea inactivării spermatozoizilor

Numărul încrucişării	Fenotipul şi genotipul părinţilor		Fenotipurile în descendenţă	
	♀	♂	Spermă inactivă (ginogeneză) (%)	Spermă normală (control) (%)
1^1	fără solzi ss	cu solzi SS	fără solzi 100	cu solzi 100
2^2	culoare oranj $b_1b_1b_2b_2$	întunecat $B_1B_1B_2B_2$	transparenţi 100	pigmentaţi 100
3^1	transferină AA	transferină BC	AA, 100	AB, 50 AC, 50

1^1, 3^1 = analiza puietului de o vară
2^2 = analiza embrionilor şi larvelor

În concluzie, putem afirma că randamentul de producere a descendenţelor ginognetice diploide este determinat de frecvenţa diploidizării cromosomilor femeli şi supravieţuirea indivizilor ginogenetici în etapele postembrionare. Cercetările efectuate au stabilit că aceşti factori depind într-o foarte mare măsură de constituţia ereditară a femelelor. De exemplu, randamentul spontan al diploizilor ginogentici, în descendenţele femelelor de crap din ramificaţii ale speciei central-ruse reprezintă sutimi dintr-un procent, iar în descendenţele femelelor hibride (F1 din încrucişarea crapului local cu cel japonez) este cu 1 – 2 ordine de mărime mai mare.

În cea de-a doua generaţie şi în generaţiile următoare ale ginogenezei induse, care urmează a fi folosit în lucrările de selecţionare, randamentul spontan de obţinere a diploizilor este mult mai ridicat (în medie 1 – 2%). Aceasta asigură obţinerea unor loturi ginogenetice de masă fără utilizarea acţiunilor prin şocuri, ceea ce simplifică simţitor tehnologia metodei.

2.1.2.5. Obţinerea descendenţei ginogenetice la crap, utilizând gameţi manipulaţi genetic

Au fost utilizate icre de la femele de crap comun (*Cyprinus carpio* L.) – homozigote recesive – şi lapţi proveniţi de la masculi aparţinând aceleiaşi specii (homozigoţi dominanţi). Viabilitatea spermatozoizilor a fost testată pentru fiecare mascul cu ajutorul unui microscop, prin observarea mobilităţii în mediu lichid, după activarea cu apă.

Inactivarea gameţilor şi fertilizarea, îngrijirea embrionilor şi urmărirea dezvoltării au fost efectuate conform tehnologiilor uzuale aplicate în creşterea artificială a crapului.

Experimentele au fost efectuate în cadrul Staţiunii de Cercetare şi Producţie Piscicolă Nucet – Dâmboviţa. Condiţiile experimentale sunt prezentate în Tabelul 3, iar etapele şi tehnica inducerii artificiale a ginogenezei în figurile 4 şi 5 (Nicolescu, 1997, 2002).

Tabel 3. Rata de supraviețuire a puietului ginogenetic haploid (după Nicolescu, 2002)

Descendență	Tratamente cu radiații			Rata absolută de supraviețuire (%)			Supraviețuire relativă în stadiul III (%)
	Tipul radiației	Doza de radiații		Stadiul I (%)	Stadiul II (%)	Stadiul III (%)	
		Durata (min.)	Distanța (cm)				
Haploizi ginogenetici	UV – LS	3	10	78,00	99,00	0,66	0,58
		5	10	54,05	43,24	-	1,51
		5	7	63,15	63,15	9,90	5,56
		5	10	39,95	68,42	5,31	6,29
		7	10	68,42	52,63	8,88	5,14
		10	10	60,52	57,89	7,54	4,39
		7	15	73,68	70,94	10,09	5,87
		10	15	73,68	71,05	9,81	5,72
		15	15	57,56	54,93	8,09	4,71
		20	15	72,72	62,50	0,56	0,54
	UV – BLF	5	15	48,48	37,50	0,26	0,24
		10	20	60,61	50,00	0,33	0,27
		20	20	60,61	56,25	0,45	0,35
		10	35	72,72	56,25	0,56	0,45
		20	35	60,61	56,25	0,35	0,27
	Gama	800		78,39	64,33	0,89	0,42
		1000		65,23	55,55	0,47	0,39
		1200		48,56	53,12	0,13	0,14

Pentru producerea descendenței homozigote, icrele sunt activate cu material seminal inactivat genetic. Setul haploid de cromosomi materni se poate replica o dată, iar migrarea cromosomilor duplicați în două celule este oprită prin şocuri termice. În consecință, se produce o celulă cu două seturi identice de cromosomi.

➢ Descendența ginogenetică haploidă a fost obținută prin fertilizarea icrelor cu lapți inactivați genetic;

➢ Descendența ginogenetică diploidă a fost obținută prin fertilizarea icrelor după un tratament prealabil de diploidizare artificială, cu lapți inactivați genetic.

Pentru obținerea de embrioni viabili, icrele haploide au fost în prealabil diploidizate.

➢ Descendența ginogenetică diploidă meiotică a fost obținută prin fertilizarea icrelor în prealabil tratate pentru diploidizare sau la scurt timp după inseminare (pentru a reține al doilea corp polar în interiorul celulei ou) cu lapți inactivați genetic.

➢ Descendența ginogenetică diploidă mitotică a fost obținută prin fertilizarea icrelor tratate în vederea diploidizării, după inseminare (pentru inducerea endomitozei la prima diviziune a zigotului) cu spermă inactivată genetic.

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Icrele diploide activate cu lapți inactivați genetic cu UV sunt supuse la şocuri termice în timpul primei diviziuni mitotice. Şocurile termice au rolul de a preveni diviziunea celulară (au fost utilizate pentru a inhiba a doua diviziune meiotică sau citokineza).

Inactivarea genetică a lapților a fost realizată utilizând radiații UV sau gama (Nicolescu, 1994, 1996). Diploidizarea icrelor sau a zigotului a fost realizată utilizând şocuri termice calde sau reci, tratamente chimice cu colchicină sau tratamente mixte cu substanțe chimice şi şocuri termice (Nicolescu, 1996).

Originea ginogenetică a puietului a fost demonstrată prin analiza şi evidențierea caracterelor recesive moştenite.

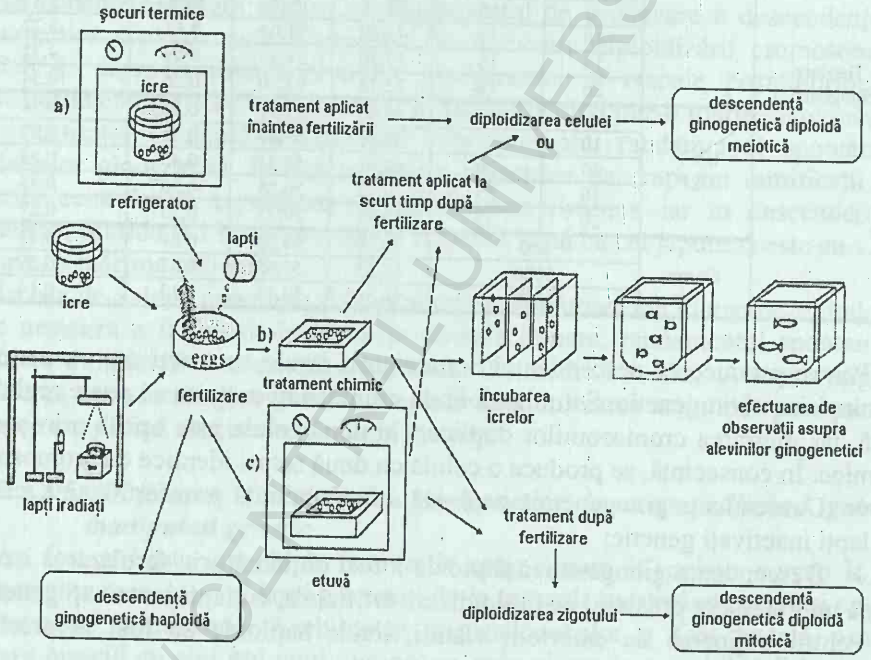


Figura 4. Etapele tehnicii de diploidizare a materialului genetic aparținând gameților proveniți de la *Cyprinus carpio* L. (după Nicolescu, 2002)

BCU IAŞI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

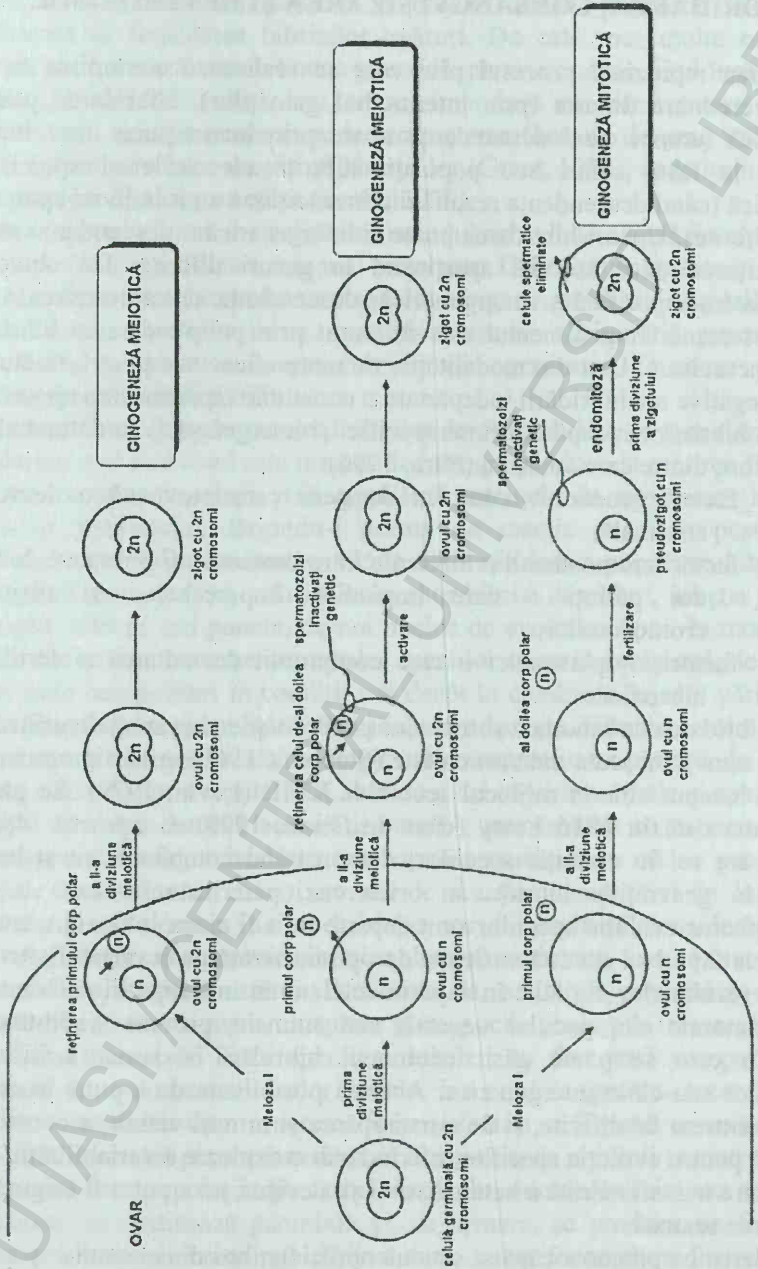


Figura 5. Mecanismul de inducere a diploidizării (după Nicolescu, 2002)

BCU IASI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

2.2. HIBRIDAREA, CONSANGVINIZAREA ŞI HETEROZISUL

Hibridarea reprezintă procesul prin care se realizează contopirea a două informaţii ereditare diferite (prin intermediul gameţilor). Hibridarea poate fi intraspecifică (atunci când descendenţa apare prin încrucişarea unor indivizi aparţinând la rase, soiuri sau populaţii diferite ale aceleiaşi specii) sau interspecifică (când descendenţa rezultă din încrucişarea unor indivizi aparţinând la specii diferite). Uneori hibridarea poate fi intergenerică – descendenţa rezultă din încrucişarea unor indivizi aparţinând la genuri diferite. De obicei, în încrucişarea interspecifică şi intergenerică, descendenţa se caracterizează prin viabilitate scăzută. Impedimentul este înlăturat prin poliploidizarea hibrizilor, prin retroîncrucişare. Una din modalităţile de mare eficacitate pentru înlăturarea efectelor negative ale hibridării îndepărtate o constituie reproducerea apomictică. Sterilitatea hibrizilor îndepărtaţi (interspecifici şi intergenerici) se datorează mai multor factori, dintre care amintim (Băra, 1996):

1. factori genetici – complex de gene care provoacă o dezvoltare anormală;
2. factori cromosomali – diferenţe între cromosomii proveniţi de la cei doi părinţi – care împiedică împerecherea şi disjuncţia cromosomilor;
3. factori citoplasmatici – care compromit dezvoltarea şi fertilitatea hibrizilor.

Deşi hibridarea ca fenomen şi mai ales posibilităţile şi avantajele utilizării ei în practică sunt cunoscute din Antichitate (Stebbins, 1969), investigarea în mod ştiinţific a început abia la mijlocul secolului XVIII (Levin, 1979). Se pare că pentru prima dată în 1916 Lotsy (citat de Levin, 1979) a exprimat ideea că hibridarea are rol în evoluţia speciilor, demonstrând complexitatea şi bogăţia hibridării în generaţiile hibride. În orice caz, părerile referitoare la rolul hibridării pentru evoluţia speciilor sunt departe de a fi ajuns la unanimitate. Nu trebuie omis faptul că această varietate de opinii, bazată pe o variabilitate la fel de vastă a rezultatelor obţinute în experimente sau în investigaţiile efectuate pe populaţii naturale ale speciilor vegetale sau animale, provine şi dintr-o altă ipostază în care se poate găsi fenomenul hibridării – aceea a hibridării interspecifice sau chiar intergenerice. Această posibilitate de a pune în contact genotipuri extrem de diferite, şi de a mai apărea şi urmaşi viabili, a constituit o mare şansă pentru evoluţia speciilor, oferind atât o explozie a variabilităţii, cât şi o manifestare nemaiîntâlnită a heterozisului şi, desigur, nu a putut fi asigurată de reproducerea sexuată.

Hibridarea ca proces a căpătat o nouă apreciere, noi dimensiuni – s-a ajuns la constatarea că hibridarea are o deosebită valoare evolutivă, mai ales dacă este

urmată de o încorporare selectivă a genelor dintr-o populaţie în alta şi de stabilizarea şi fertilitatea hibrizilor apăruţi. De cele mai multe ori, selecţia naturală promovează variabilitatea genetică, prima condiţie fiind însă ca aceasta să apară, hibridarea având deci un rol important din acest punct de vedere. Concomitent, selecţia poate duce la întreruperea fluxului de gene între indivizii hibrizi apăruţi sau între aceştia şi părinţii lor (Grant, 1977), constituind o cale de împiedicare a irosirii gameţilor (Levin, 1979).

Aprecierea originii şi a calităţilor unui hibrid se întemeiază doar pe unul sau pe câteva criterii, nu dintre cele mai elocvente. Dificultăţile sporite în aprecierea rolului evolutiv al schimbului interspecific de gene rezidă din imposibilitatea de a detecta şi mai ales de a cuantifica aceste schimburi, precum şi din imposibilitatea de a cunoaşte hibrizii din generaţia F1 doar pe criterii morfologice (Ornduff, 1969).

Pe baza cunoştinţelor acumulate până la această dată se apreciază totuşi că hibridarea, mai ales când este urmată de introgresie, duce la mărirea flexibilităţii evolutive a unei populaţii şi îi amplifică potenţele de exploatare intensivă a resurselor habitatului, lărgindu-i norma de reacţie cu mult peste limitele populaţiei nehibride (Anderson, 1954). Evoluţia într-o populaţie hibridă poate porni pe căi complet noi, prin izolarea unor hibrizi deosebiţi, aceştia jucând pur şi simplu rolul de noi puncte, de noi nuclee de evoluţie. Apoi, în mod obişnuit, hibrizii vor utiliza noi nişe din arealul speciilor ce se încrucişează, deoarece vor fi mai buni competitori în condiţii noi decât în condiţiile în care părinţii lor au vieţuit timp îndelungat şi au căpătat adaptări adecvate. Hibrizii au alte aptitudini, alte cerinţe şi alte posibilităţi ecologice, în comparaţie cu părinţii. În perioadele recente s-au constatat o puternică alterare a habitatelor naturale şi apariţia de noi condiţii, mai ales datorită activităţii omului, concomitent cu ruperea barierelor dintre specii. Astfel, hibridarea are tot mai multe şanse să se producă şi să genereze indivizi noi, cu noi norme de reacţie, competitivi în lupta pentru cucerirea şi colonizarea noilor habitate. Ar fi greşit să considerăm însă că perturbările care apar astăzi, mai ales datorită activităţii umane, sunt cele mai puternice din istoria biosferei. Fără îndoială, astfel de perturbări, desigur de magnitudine mult mai mare, au apărut şi în epocile geologice trecute. Şi atunci s-au produs încrucişări între specii şi hibrizii au fost mai competitivi decât parentalii în colonizarea noilor areale inaccesibile pentru taxonii existenţi anterior. Cumularea tuturor acestor forţe şi factori ar fi putut constitui un punct de plecare favorabil pentru formarea de noi specii, de noi linii evolutive.

În cazul unor populaţii, din cauza numărului mic de indivizi sau a mobilităţii lor reduse, se realizează panmixia şi, ca urmare, se produce un fenomen de **consangvinizare** (inbreeding). Prima dată, acest fenomen a fost observat la începutul secolului XX de W. Johannsen. Prin consangvinizare, adică prin

fecundare între indivizi înrudiţi, la animalele bisexuate se pot obţine **linii consangvine**, cu un grad mai mic sau mai mare de homozigoţie.

Organismele consangvine prezintă, de obicei, o depresiune biologică, având o vitalitate mai redusă ca a organismelor heterozigote. Fenomenul „depresiunii consangvine" este opus „vigorii hibride" sau **heterozisului**, care apare la hibrizii din prima generaţie, obţinuţi prin încrucişarea între organisme neînrudite.

Efectul genetic cel mai important al consangvinizării îl constituie mărirea gradului de homozigoţie a unei populaţii panmictice. Astfel, cercetările au arătat că în fiecare generaţie în care intervine consangvinizarea se reduce procentul heterozigoţilor la jumătate şi se măreşte cel al homozigoţilor.

După cum se ştie, în natură apar permanent mutaţii la plante şi animale, din care majoritatea sunt letale, semiletale sau care influenţează negativ organismele. Selecţia naturală elimină relativ repede mutantele dominante sau semidominante, în timp ce mutaţiile recesive, care reprezintă majoritatea, sunt păstrate la organismele heterozigote. Ca urmare, populaţiile naturale conţin un procent important de gene recesive dăunătoare. Prin consangvinizare se reduce rapid numărul de organisme heterozigote şi respectiv procentul de gene recesive dăunătoare, care sunt eliminate odată cu liniile respective consangvinizate ce le conţin.

2.2.1. LINIILE PURE ŞI VIGOAREA HIBRIDĂ

Cercetarea transmiterii caracterelor ereditare în decursul generaţiilor are drept principal scop crearea şi înmulţirea indivizilor cu însuşiri valoroase. Se urmăreşte îmbunătăţirea sau ameliorarea acestor însuşiri. Diversele rase actuale au fost selecţionate şi păstrate prin alegerea pentru reproducere a animalelor ce prezintă caractere asemănătoare, în acest fel menţinându-se rasele „pure" sau „curate".

Cel mai simplu mijloc de realizare a unor rase pure este înmulţirea unor animale înrudite. În acest fel, chiar dacă organismele de la care s-a plecat erau impure genetic, caracterele se separă prin segregare în primii ani, iar indivizii ce prezintă caractere nedorite pot fi eliminaţi dacă nu manifestă interes economic.

Într-o linie pură, indivizii sunt foarte asemănători şi omogeni din punct de vedere genetic. Primele generaţii rezultate prin consangvinizare sunt de multe ori extrem de variate datorită segregării caracterelor. După 6 – 7 generaţii însă, descendenţii devin tot mai uniformi şi variabilitatea scade tocmai datorită selecţionării indivizilor puri din punct de vedere genetic.

Un alt avantaj pe care îl prezintă crearea liniilor pure este faptul că, odată cu realizarea organismelor pure din punct de vedere genetic, se pot elimina o serie de gene recesive dăunătoare. După cum se ştie, în natură apar mereu modificări

bruşte ale eredităţii, numite mutaţii, care afectează una sau mai multe gene din patrimoniul ereditar. Marea majoritate a acestor gene sunt dăunătoare, putând provoca moartea organismelor sau să influenţeze negativ o serie de caractere de interes economic. Când asemenea gene mutante apărute brusc sunt dominante sau semidominante, sunt eliminate relativ repede în natură, deoarece se manifestă şi, fiind dăunătoare organismului, duc la moartea sa timpurie. Când însă asemenea mutaţii sunt recesive – şi marea lor majoritate sunt recesive, se păstrează şi se transmit mascat timp de mai multe generaţii în organismele impure din punct de vedere genetic. Prin consangvinizare numărul descendenţilor impuri obţinuţi se reduce rapid, iar genele recesive dăunătoare care apar sunt eliminate de către om odată cu liniile la care ele se manifestă.

Cu toate că liniile de animale pure sunt întotdeauna inferioare ca producţie celor din care provin şi aparent nu prezintă importanţă economică, majoritatea laboratoarelor de genetică produc linii consangvinizate. Aceasta deoarece prin ginogeneză sau consangvinizare se realizează linii pure, cu patrimoniul ereditar curat, uniform şi bine cunoscut, condiţie esenţială pentru producerea ulterioară a indivizilor cu caractere dorite. Ele sunt ulterior folosit ca material pentru încrucişări deoarece, în asemenea cazuri, se manifestă un fenomen total opus consangvinizării, şi anume apariţia vigorii hibride.

Hibrizii rezultaţi în primul an după încrucişare sunt în marea majoritate a cazurilor mai viguroşi, au o productivitate mai mare, o dezvoltare mai rapidă, sunt mai rezistenţi decât genitorii la condiţiile aspre de mediu. Cu cât provin din indivizi mai deosebiţi biologic, cu atât vigoarea hibridă este mai accentuată.

Cu toate avantajele sale, heterozisul prezintă şi neajunsuri. El apare puternic în prima generaţie hibridă şi se reduce simţitor în generaţia a doua şi în următoarele. Una din cauzele apariţiei vigorii hibride este aceea că hibrizii primei generaţii rezultă din unirea în procesul fecundării a unor gameţi diferiţi din punct de vedere genetic, ceea ce duce la formarea unor organisme ce întrunesc o zestre ereditară heterogenă, cu un grad ridicat de impuritate genetică. În generaţiile următoare, datorită segregării şi scăderii diferenţei dintre gameţi, se revine la echilibrul genetic normal şi se observă o reducere treptată a efectelor favorabile ale încrucişării, astfel încât, de fapt, heterozisul este caracteristic numai primei generaţii hibride.

Deocamdată, cauzele producerii heterozisului nu sunt bine cunoscute. Există mai multe teorii, una dintre ele fiind teoria dominanţei, conform căreia heterozisul este explicat pin relaţia dintre mai multe gene dominante şi recesive conţinute în zestrea ereditară a hibridului. Conform cu această teorie, vigoarea hibridă s-ar datora faptului că diferite perechi de gene se pot influenţa reciproc, completându-se, astfel încât, împreună, ele dau un efect favorabil sporit faţă de efectul fiecărei gene în parte. Este vorba, aşadar, de o însumare avantajoasă a

unor gene care interacţionează. Cumularea lor într-un singur organism hibrid poate avea rezultate mai bune decât în fiecare dintre părinţi în parte.

O altă teorie (a heterozigoţiei sau a stimulării) pune heterozisul pe seama utilităţii genetice a hibrizilor. Organismele hibride întrunesc perechi de gene opuse, ceea ce are un efect stimulator asupra creşterii şi dezvoltării. Cu cât numărul perechilor de gene (dominante – recesive) prin care diferă părinţii este mai mare, cu atât vigoarea hibridă a urmaşilor este mai accentuată. Această teorie explică totodată şi cauza vitalităţii scăzute a liniilor consangvinizate datorită purităţii genetice.

Date fiind marea importanţă a heterozisului şi complexitatea acestui fenomen, complexitatea mecanismului său constituie unul dintre domeniile centrale ale cercetărilor actuale în genetică, îndreptate în direcţia lărgirii sferei aplicării lui în producţie.

2.2.2. EFECTELE GENETICE ALE CONSANGVINIZĂRII

Între încrucişarea consangvină şi cea heterologă există o multitudine de faze de tranziţie. În cazul animalelor, se pot întâlni cele două extreme (consangvinizarea completă şi încrucişarea heterologă, adică hibridarea cu alte specii), însă foarte rar, în general fiind aproape absente.

Fiecare specie are propriul său sistem genetic de reproducere, de obicei plasat între cele două extreme, fapt care-i dă posibilitatea să supravieţuiască şi să se reproducă optim.

Încrucişarea heterologă (hibridarea) permite o mare flexibilitate genetică datorită variabilităţii genotipice, fapt care creează o mare plasticitate ecologică. Aceasta se realizează cu preţul apariţiei unor combinaţii inferioare, neadaptate, sterile, care sunt, evident, rapid eliminate. Tipul acesta de încrucişare este caracteristic organismelor cu structură complexă şi cu un număr redus de descendenţi.

Încrucişarea consangvină favorizează fixitatea genetică, conservarea unui fond de gene care permite prosperarea populaţiei într-un anumit mediu ambiant, dar îi reduce posibilităţile de adaptare la mediul variabil.

Efectul genetic cel mai important al consangvinizării constă în mărirea gradului de homozigoţie a unei populaţii panmictice. Dacă, de exemplu, se încrucişează două organisme homozigote deosebite printr-o pereche de gene alele (*AA x aa*), se obţine o primă generaţie complet heterozigotă (*Aa*). În generaţia a doua, prin încrucişare cu un individ având acelaşi genotip, organismele heterozigote rezultate în urma segregării (25% *AA* + *50% Aa* + *25% aa*) reprezintă numai 50% din populaţie, iar în generaţia a treia numai 25% din populaţie.

BUCHAREST UNIVERSITY LIBRARY CENTRAL

Prin consangvinizare are loc deci o reducere a heterozigoţiei, fapt care determină homozigotarea organismelor şi respectiv manifestarea genelor recesive. Datorită faptului că în natură apar permanent mutaţii, din care majoritatea sunt letale, semiletale sau dăunătoare, prin consangvinizare aceste mutaţii recesive se pot manifesta. Se poate deci spune că prin consangvinizare există posibilitatea cunoaşterii genotipului organismelor, a încărcăturii lor genetice, la care numeroase gene se găsesc în stare recesivă. Astfel, se poate spune că prin consangvinizare există posibilitatea determinării „variabilităţii genetice ascunse", adică a evidenţierii genelor recesive care, de obicei fiind în stare heterozigotă, nu se manifestă.

La organismele cu fecundare încrucişată, care sunt deci în mod natural heterozigote, există o mare variabilitate genetică ascunsă şi ca urmare depresiunea consangvină este foarte puternică.

Consangvinizarea are importante aplicaţii practice, deoarece prin consangvinizare (inbreeding) se măreşte considerabil constanţa morfologică, fiziologică, biochimică etc. a tipului respectiv, în timp ce prin încrucişare (outbreeding) se micşorează constanţa tipului şi se măreşte vigoarea indivizilor. Datorită încrucişării, se menţine un nivel ridicat al heterozigoţiei, iar selecţia naturală poate acţiona eficient.

Consangvinizarea moderată este utilizată pentru crearea de rase noi, astfel că în prezent, la multe rase de animale, toţi indivizii sunt mai mult sau mai puţin înrudiţi între ei. Prin ameliorarea cu ajutorul consangvinizării se înţelege încrucişarea între indivizi mai înrudiţi între ei decât media înrudirii în cadrul populaţiei respective, iar prin încrucişare se înţelege împerecherea între indivizi mai puţin înrudiţi între ei decât media populaţiei.

În funcţie de gradul de înrudire se pot deosebi mai multe tipuri de consangvinizări (Raicu, 1980):

1. consangvinizare strânsă, când împerecherea se face între rude de gradul întâi;
2. consangvinizare apropiată, când pentru împerechere se folosesc rude de gradul doi;
3. consangvinizare moderată, când împerecherea se face între rude de gradul trei;
4. consangvinizare îndepărtată, când se împerechează rude de gradul patru.

În general, este utilizată consangvinizare moderată, în scopul conservării unor caractere valoroase obţinute în urma unor hibridări anterioare. În acest scop se limitează numărul indivizilor din grupul supus consangvinizării, fapt care duce la micşorarea variabilităţii şi la creşterea uniformităţii tipului respectiv.

Uneori, se înregistrează efecte negative ale consangvinizării, prin aceea că duce la homozigotarea unor gene recesive negative.

Încrucişarea între linii sau rase diferite (outbreeding) duce la apariţia heterozisului datorită căruia animalele cresc mai repede, sunt mai viguroase şi adesea mai productive decât liniile genitoare. Prin încrucişarea între rase este, de asemenea, posibilă ameliorarea.

Încrucişarea între specii diferite (crossbreeding) este relativ dificilă, din cauză că hibrizii sunt de obicei sterili. Este adevărat că uneori hibrizii de acest fel manifestă heterozis puternic, numai că pentru obţinerea lor trebuie efectuate încrucişări în fiecare generaţie.

Prin încrucişarea între linii cu grade diferite de consangvinizare hibrizii manifestă fenomenul de heterozis şi pot fi utilizaţi direct în practică.

2.2.3. CONSAGVINZAREA şi HETEROZISUL – IMPORTANŢA LOR PRACTICĂ

Descoperirea heterozisului prezent în prima generaţie după încrucişare a dus la extinderea procedeului încrucişării în ameliorare. Hibridarea este considerată astăzi mijlocul cel mai eficace de creare a unor rase de animale cu calităţi superioare. Ea ne permite să întrunim în acelaşi organism caractere şi însuşiri provenite de la două sau mai multe forme parentale cu ereditate diferită.

Procesul de creare a hibrizilor între linii consangvinizate are trei etape mai importante:

a. crearea de linii consangvinizate;
b. alegerea celor mai bune linii consangvinizate;
c. încrucişarea între linii consangvinizate, în vederea producerii de hibrizi simpli (AxB), de hibrizi între trei linii consangvinizate (AxB)xC, de hibrizi dubli (AxB)x(CxD) sau între mai multe linii consangvinizate (6 – 16) pentru obţinerea de hibrizi sintetici.

În practică, se urmăreşte în momentul de faţă obţinerea heterozisului pe două căi fundamentale: pe de o parte, realizarea vigorii hibride prin încrucişarea unor rase cu calităţi superioare, iar pe de altă parte, crearea hibrizilor în urma încrucişării liniilor consangvinizate. Hibrizii între linii consangvinizate sunt aproape întotdeauna mai valoroşi decât cei între soiuri sau rase. Când la încrucişare se folosesc două linii consangvinizate, două soiuri sau două rase, se obţin aşa-numiţii „hibrizi simpli".

Aprofundarea studiilor asupra heterozisului şi a consangvinizării a adus după sine utilizarea pe scară tot mai largă a hibridărilor simple între linii consangvinizate, întrucât în asemenea cazuri fenomenul de heterozis este foarte puternic. Hibrizii între linii consangvinizate şi-au găsit o largă aplicare în obţinerea hibrizilor dubli.

BOKU UNIVERSITY LIBRARY

Hibridarea dublă constă în încrucişarea a doi hibrizi simpli, pentru obţinerea unui hibrid dublu folosindu-se patru forme parentale diferite, de obicei patru linii consangvinizate. În primul an se face hibridarea simplă prin încrucişarea liniei A cu B şi a liniilor C x D. Hibridul rezultat din prima încrucişare se încrucişează la rândul său cu hibridul rezultat din a doua combinaţie, astfel încât ia naştere un hibrid dublu la care heterozisul este de obicei foarte accentuat.

Aici apare o dificultate, şi anume scăderea vitalităţii şi a însăşi capacităţii de reproducere a animalelor. Prin creşterea gradului de consangvinizare productivitatea animalelor poate să scadă până la dispariţia totală a unor linii. Pierderile economice pe care le cauzează consangvinizarea (scăderea vitalităţii, micşorarea prolificităţii sau sterilitate, debilitate, intensitate scăzută de creştere), explică şi faptul că mulţi cercetători ezită în folosirea acestei metode de ameliorare. De aceea se urmăreşte uniformizarea genetică a animalelor, prin crearea unor linii numai parţial consangvinizate (15 – 25%). Aceste linii sunt totuşi suficient de omogene şi nu-şi pierd prea mult valoarea economică.

2.2.4. HIBRIDAREA INTERSPECIFICĂ

Arătam anterior că rezultatele unei hibridări sunt cu atât mai bune cu cât indivizii încrucişaţi diferă mai mult între ei.

Cromosomii diferitelor specii diferă nu numai ca număr, dar în special din punctul de vedere al genelor conţinute, adică al caracterelor ereditare transportate (nu sunt omologi). Imposibilitatea împerecherii cromosomilor cauzează o necompatibilitate genetică atât de pronunţată, încât noul organism fie nu ajunge să se dezvolte, fie este steril. Iată deci că răspunzători direct de existenţa barierei genetice între specii sunt cromosomii. Aceasta este cauza principală a neobţinerii hibrizilor între specii sau, cum se spune, a rezistenţei la încrucişare a speciilor diferite.

Hibridarea între specii poate fi făcută cu succes, dacă deosebirea dintre cromosomii speciilor încrucişate nu este prea mare.

Cel mai adesea însă, garniturile cromosomiale între specii sunt diferite, neomoloage şi hibrizii sterili, din cauza imposibilităţii împerecherii cromosomilor proveniţi de la cele două specii.

Hibrizii proveniţi din încrucişarea între specii cu un număr diferit de cromosomi care însumează numărul total de cromosomi ai celor două specii se numesc amfiploizi.

Hibridarea între specii se numeşte hibridare îndepărtată sau interspecifică. Ea constituie un izvor important pentru obţinerea de noi specii în natură.

Hibridarea artificială între specii este utilizată pentru obţinerea unor modificări ale eredităţii organismelor. Prin încrucişarea între specii cu număr

diferit de cromosomi, pot lua naştere indivizi care să conţină în garnitura cromosomială numai unul, doi sau mai mulţi cromosomi proveniţi de la altă specie.

De cele mai multe ori însă, hibrizii interspecifici la animale sunt sterili şi încercările de restabilire a fertilităţii acestora nu au dat rezultate pozitive. Cu cât un organism este mai evoluat, cu atât stabilitatea sa genetică este mai mare, adică bariera genetică dintre specii este mai pronunţată şi mai profundă.

În ultimul timp, se acordă o mare atenţie încrucişării între diferite specii de peşti de cultură, prin realizarea pontelor artificiale, deoarece s-a observat că la aceste organisme, fenomenul de heterozis este extrem de accentuat.

Hibridarea se poate realiza şi în mod natural, fără intervenţia omului. În procesul de evoluţie şi răspândire a fiinţelor vii pe pământ, hibridarea a dus la sporirea diversităţii speciilor. Până a ajunge la ceea ce este astăzi, lumea vie a parcurs un îndelungat proces de evoluţie şi de transformare care a durat milioane de ani. Aceasta a permis apariţia varietăţii enorme de specii existente în prezent în natură.

Mergând pe firul istoriei unor specii mai importante, oamenii de ştiinţă au reuşit să dovedească originea lor hibridă, ceea ce înseamnă că şi în natură hibridarea este destul de frecventă.

Hibridarea în cazul ciprinidelor se realizează ca şi în cazul altor specii de cultură, după o schemă clasică, prin încrucişarea artificială între rase aparţinând aceleiaşi specii (hibridare apropiată intraspecifică) sau între indivizi aparţinând la specii diferite ale aceluiaşi gen (hibridare interspecifică). Este cunoscută şi hibridarea între specii cu perioade diferite de reproducere, caz în care este necesară crioconservarea materialului seminal. În acest sens, se colectează material seminal de la reproducători masculi, prin metoda „mulgerii" (Decei, 1978). Aprecierea mobilităţii spermatozoizilor se poate face la o lupă binoculară, după o prealabilă diluţie cu apă distilată (1/40) (Billard, 1980).

Crioconservarea şi decongelarea materialului seminal s-a făcut după schema prezentată în Figura 6 (Stein, 1975 şi Stoss, 1979 – citaţi de Apetroaei şi Pricope, 1998).

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

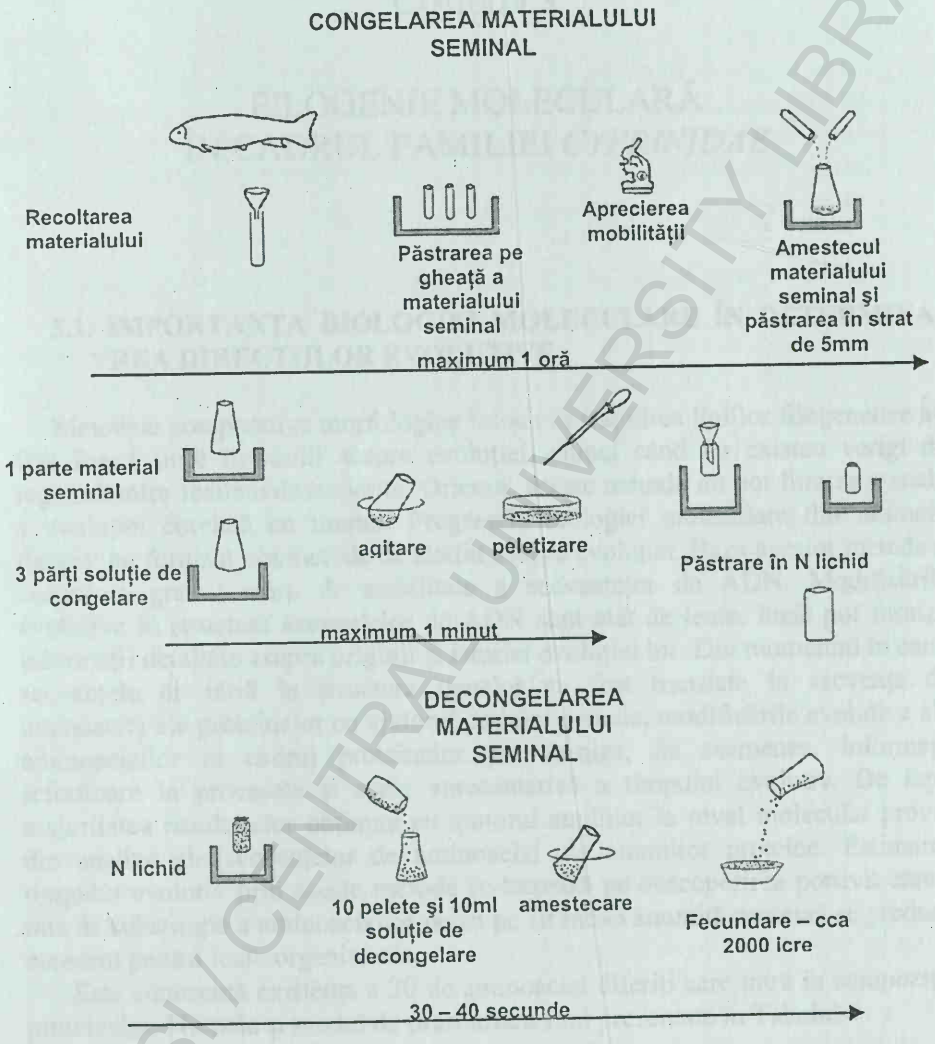


Figura 6. Crioconservarea şi decongelarea materialului seminal (Stoss, 1979, după Apetroaei şi Pricope, 1997)

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

CAPITOLUL 3

FILOGENIE MOLECULARĂ ÎN CADRUL FAMILIEI *CYPRINIDAE*

3.1. IMPORTANȚA BIOLOGIEI MOLECULARE ÎN DETERMINAREA DIRECȚIILOR EVOLUTIVE

Metodele comparative morfologice folosit în stabilirea liniilor filogenetice au fost foarte utile în studii asupra evoluției, atunci când nu existau verigi de legătură între fosilele descoperite. Oricum, aceste metode nu pot furniza o scală a evoluției corelată cu timpul. Progresele biologiei moleculare din ultimele decenii au furnizat noi metode de studiu asupra evoluției. Baza acestor metode o constituie gradul mare de stabilitate a secvențelor de ADN. Modificările evolutive în structura secvențelor de ADN sunt atât de lente, încât pot furniza informații detaliate asupra originii și istoriei evoluției lor. Din momentul în care, secvențele ce intră în structura genelor au fost translate în secvențe de aminoacizi ale proteinelor cu ajutorul codului genetic, modificările evolutive ale aminoacizilor în cadrul proteinelor pot furniza, de asemenea, informații referitoare la procesele și scala aproximativă a timpului evolutiv. De fapt, majoritatea rezultatelor obținute cu ajutorul studiilor la nivel molecular provin din analize ale secvențelor de aminoacizi ale anumitor proteine. Estimarea timpului evolutiv prin aceste metode se bazează pe descoperirea potrivit căreia rata de substituție a aminoacizilor pe an pe sit într-o anumită proteină se produce constant pentru toate organismele.

Este cunoscută existența a 20 de aminoacizi diferiți care intră în compoziția proteinelor. Numele și modul de prescurtare sunt prezentate în Tabelul 4.

Tabel 4. Cei 20 de aminoacizi și modul de prescurtare al numelor (Dayhoff, 1978)

Nr. crt.	Nume	Abrevieri		Nr. crt.	Nume	Abrevieri	
		trei litere	o literă			trei litere	o literă
1.	Alanină	Ala	A	11.	Leucină	Leu	L
2.	Arginină	Arg	R	12.	Lizină	Lzs	K
3.	Asparagină	Asn	N	13.	Metionină	Met	M

BCU IASI - UMF UNIVERSITY LIBRARY

4.	Acid aspartic	Asp	D	14.	Fenilalanină	Phe	F
5.	Cisteină	Cys	C	15.	Prolină	Pro	P
6.	Glutamină	Gln	Q	16.	Serină	Ser	S
7.	Acid glutamic	Glu	E	17.	Treonină	Thr	T
8.	Glicină	Gly	G	18.	Triptofan	Trp	W
9.	Histidină	His	H	19.	Tirozină	Tyr	Z
10.	Izoleucină	Ile	I	20.	Valină	Val	V

3.2. ROLUL ADN MITOCONDRIAL (ADNmt)

Numărul mare de polimorfisme ale secvenţelor de nucleotide din două zone cu hipervariabilitate ale regiunii de control mitocondrial necodificatoare poate permite discriminarea între indivizi sau probe biologice. Probabilitatea recuperării ADNmt din probe biologice foarte mici sau degradate este mai mare decât în cazul ADN nuclear deoarece moleculele de ADNmt sunt prezente în mii de copii per celulă, comparativ cu ADN nuclear care se găseşte în două copii per celulă. În plus, ADNmt este moştenit numai pe linie maternă, astfel încât, în cazul în care un individ nu este disponibil pentru o comparaţie directă cu o probă biologică, orice probă provenită de la genitorul matern poate constitui o probă de referinţă.

Datorită recombinării meiotice şi moştenirii diploide a ADN nuclear, reconstituirea unui profil pe baza ADN nuclear chiar şi în cazul rudelor de gradul I este destul de greu de realizat. De asemenea, modelul moştenirii pe linie maternă a ADNmt poate fi considerat ca având unele deficienţe. Deoarece toţi indivizii pe linie maternă prezintă aceeaşi secvenţă de ADNmt, aceasta nu poate fi considerată un identificator unic. De fapt, indivizi aparent neînrudiţi pot avea o origine comună şi necunoscută, pe linie maternă.

Majoritatea animalelor au o reproducere sexuată, în timpul căreia genele se transmit de la ambii părinţi în urma recombinării prin crossing-over şi a segregării independente a cromosomilor din timpul meiozei I. Dar, genele din organite provenind din diferite linii de filiaţie nu se pot niciodată recombina şi aceasta tocmai datorită faptului că genomul organitelor (cum este şi cazul ADNmt) se transmite uniparental, şi chiar dacă s-ar transmite biparental, organitele provenite de la cei doi genitori nu ar putea fuziona astfel încât să se ajungă la o fuzionare a genomurilor. Dacă două celule parentale fuzionează, genotipurile recombinante nu se pot regăsi la nivel mitocondrial (Birky, 2001).

BCU IASI UNIVERSITY LIBRARY

3.2.1. STRUCTURA ADNmt LA SPECIILE STUDIATE

Potrivit datelor furnizate de banca de gene (NCBI GenBank – National Center for Biotechnology Information), în cazul genurilor analizate, se constată că acestea au genomurile cuprinse între 16575 perechi de baze (pb) în cazul genului *Cyprinus* şi 16580 pb în cazul genului *Carassius*. De asemenea, pentru ambele genuri s-a constatat că ADNmt este circular dublu catenar (Figurile 7 şi 8)

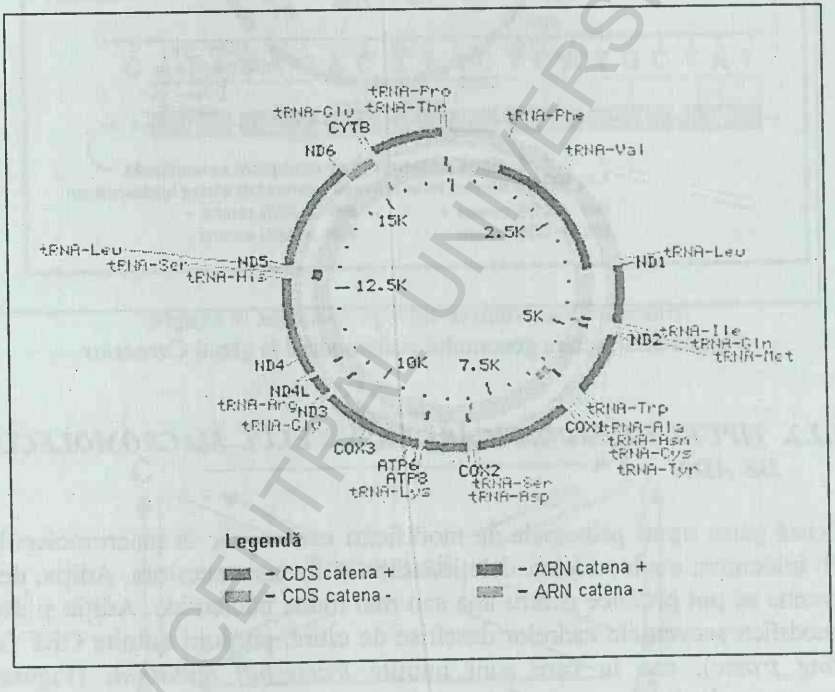


Figura 7. Structura genomului mitocondrial la genul *Cyprinus*

BCU IAŞI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

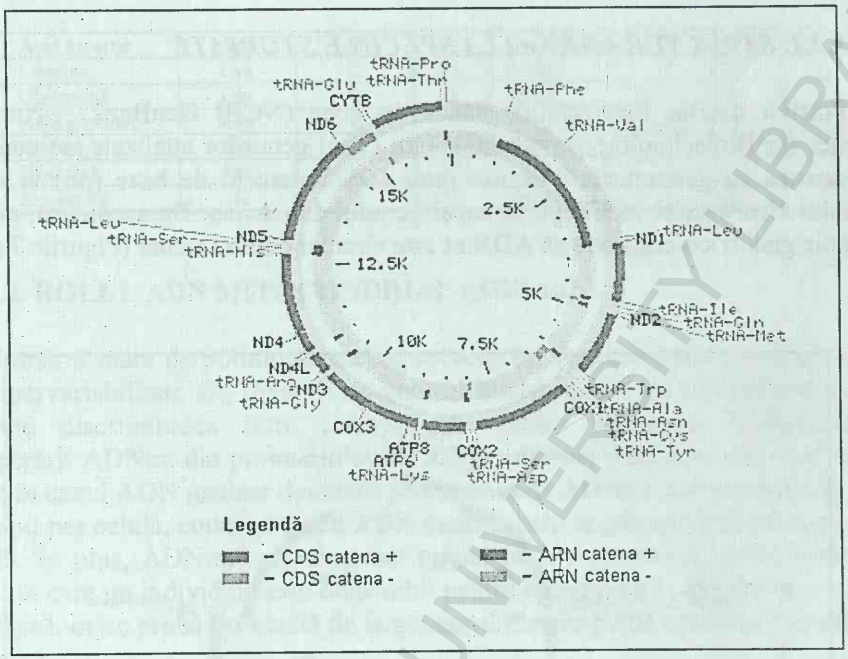


Figura 8. Structura genomului mitocondrial la genul *Carassius*

3.2.2. TIPURI DE MODIFICĂRI LA NIVELUL MACROMOLECULEI DE ADN

Există patru tipuri principale de modificări care au loc în macromolecula de ADN: înlocuirea nucleotidelor, deleția, adiția şi inversia acestora. Adiția, deleția şi inversia se pot produce pentru una sau mai multe nucleotide. Adiția şi deleția pot modifica secvențele cadrelor deschise de citire, porțiuni numite ORF (*open reading frame*), caz în care sunt numite *frameshift mutations* (Figura 9). Înlocuirea nucleotidelor poate fi împărțită în două clase: tranziții şi transversii (Figura 10). Tranzițiile reprezintă înlocuirea unei baze azotate purinice (adenină sau guanină) cu altă bază purinică sau a unei baze azotate pirimidinice (timină sau citozină) cu o altă pirimidină. Substituția nucleotidelor purinice cu nucleotide pirimidinice, sau invers, poartă numele de transversii. În majoritatea secvențelor de ADN, s-a constatat că substituția nucleotidelor prin tranziții intervine mai frecvent decât substituția prin transversii (Fitch, 1967; Gojobori *et al.*, 1982; Kocher *et al.*, 1991).

BCU "ION CREANGĂ" CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

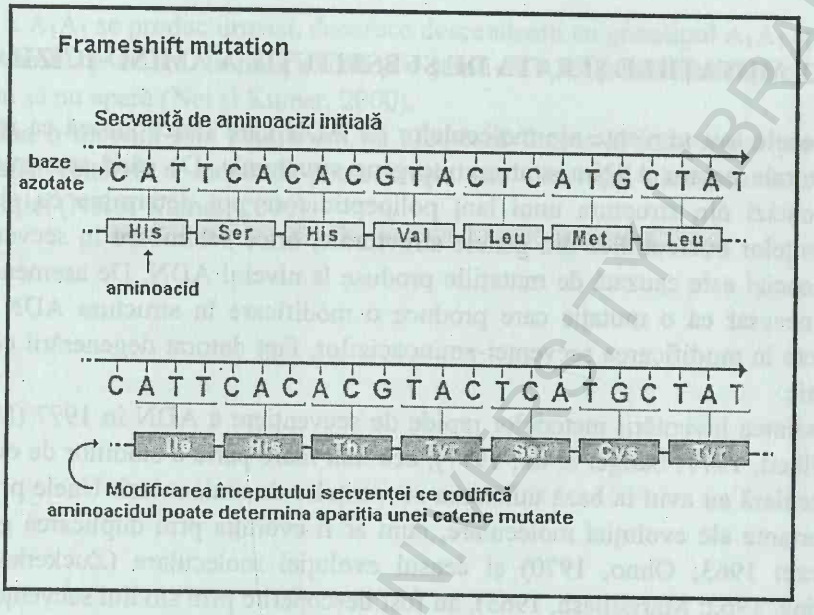


Figura 9. Modul de apariție al mutațiilor frameshift

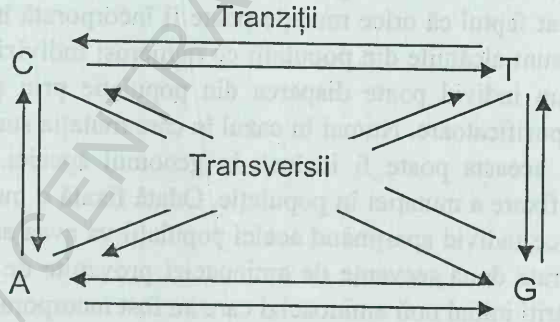


Figura 10. Cele două modalități de substituție a nucleotidelor (după Nei și Kumar, 2000)

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

3.3. MUTAŢIILE ŞI RATA DE SUBSTITUŢIE A AMINOACIZILOR

Genele sau secvenţe ale moleculelor de ADN care funcţionează ca modele structurale pentru ARNm sunt numite gene structurale. De când secvenţele de aminoacizi din structura unui lanţ polipeptidic se pot determina cu ajutorul secvenţelor nucleotidice din genele structurale, orice schimbare în secvenţa de aminoacizi este cauzată de mutaţiile produse la nivelul ADN. De asemenea, nu este necesar ca o mutaţie care produce o modificare în structura ADN să se reflecte în modificarea secvenţei aminoacizilor, fapt datorat degenerării codului genetic.

Înaintea inventării metodelor rapide de secvenţiere a ADN în 1977 (Maxam şi Gilbert, 1977; Sanger *et al.*, 1977), cea mai mare parte a studiilor de evoluţie moleculară au avut la bază utilizarea secvenţelor de aminoacizi. Unele principii importante ale evoluţiei moleculare, cum ar fi evoluţia prin duplicarea genelor (Ingram 1963; Ohno, 1970) şi ceasul evoluţiei moleculare (Zuckerkandl şi Pauling, 1962; Margoliash, 1963), au fost descoperite prin studiul secvenţelor de aminoacizi. În prezent, secvenţierea ADN este mult mai simplă decât secvenţierea aminoacizilor, care este de obicei dedusă din secvenţierea nucleotidelor prin utilizarea codului genetic (Nei şi Kumar, 2000).

Nu este adevărat faptul că orice mutaţie poate fi încorporată într-o secvenţă, deoarece speciile sunt alcătuite din populaţii cu numeroşi indivizi, iar o mutaţie nou apărută într-un individ poate dispărea din populaţie prin şansă sau prin acţiunea selecţiei purificatoare. Numai în cazul în care mutaţia survine la nivelul întregii populaţii, aceasta poate fi inclusă în genomul speciei. Acest proces poartă numele de fixare a mutaţiei în populaţie. Odată fixată o mutaţie în cadrul unei populaţii, orice individ aparţinând acelei populaţii va avea aceeaşi mutaţie. Când sunt comparate două secvenţe de aminoacizi provenite de la două specii diferite, sunt urmăriţi iniţial noii aminoacizi care au fost încorporaţi.

Când apare o mutaţie în cadrul populaţiei, supravieţuirea alelelor depinde în principal de şansă, de prezenţa sau nu a unor avantaje din punct de vedere selectiv şi de mărimea populaţiei. De exemplu, considerăm A_1 gena sălbatică şi A_2 alela. Într-un organism diploid, gena mutantă apare iniţial în stare heterozigotă (A_1A_2). În urma încrucişării A_1A_2 x A_1A_1, dacă nu rezultă descendenţi (generaţia F1) din diferite cauze biologice (de exemplu, sterilitatea homozigotului A_1A_1), gena mutantă va dispărea în generaţia următoare. Supravieţuirea genei alele nu este sigură nici chiar dacă în urma încrucişării

A_1A_2 x A_1A_1 se produc urmaşi, deoarece descendenţii cu genotipul A_1A_2 apar cu o probabilitate de 0,5. În plus, există şi o şansă de 0,25 ca descendenţii cu acest genom să nu apară (Nei şi Kumar, 2000).

Când o mutaţie este neutră sau nu afectează fitness-ul individului purtător, frecvenţa relativă a mutantei poate creşte sau descreşte aleatoriu în cadrul populaţiei (Nei şi Kumar, 2000).

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

CAPITOLUL 4

MATERIAL ŞI METODE

Un prim obiectiv al cercetărilor a fost cel de stabilire a omogenității loturilor, urmat de stabilirea cantității totale de ADN pentru diferite specii şi subspecii ale genurilor *Carassius* şi *Cyprinus*, stabilirea unor intervale de variație a cantității de ADN pentru diferite țesuturi, provenind de la indivizi diferiți ai celor două genuri, amplificarea genelor luate în studiu, verificarea acestora în electroforeză, urmată de purificare şi reacția de secvențiere.

4.1. DETERMINAREA UNOR PARAMETRI ŞI INDICI FENOTIPICI LA INDIVIZII STUDIAȚI

Asupra indivizilor aparținând celor două specii de ciprinide utilizați pentru dozarea acizilor nucleici, s-au efectuat măsurători, urmărindu-se o serie de parametri fenotipici (Lt = lungime totală; Ls = lungime standard; g = greutate individuală; C = circumferință; H_d = înălțime maximă; H_a = înălțime minimă; L_c = lungime cap) şi de indici fenotipici (indice de profil = Lt / H_d; coeficient Fulton = g x 100 / Ls^3; indice de circumferință (Kiselev) = Ls / C şi raportul L_c x 100 / Lt) (Gorgan *et al.*, 2000).

Determinarea parametrilor fenotipici s-a realizat potrivit indicațiilor din figura 11 (Voican *et al.*, 1974, 1975), respectiv:

– lungimea totală a peştelui *(Lt)* este distanța de la vârful botului până la linia care unește vârfurile lobilor înotătoarei caudale;

– lungimea standard *(Ls)* este distanța de la vârful botului până la extremitatea învelişului solzos, la baza înotătoarei caudale;

– lungimea capului *(L_c)* este distanța de la vârful botului până la marginea posterioară a osului opercular, fără membrana branhiostegală;

– înălțimea maximă a corpului *(H_d)* se măsoară în regiunea cea mai lată a corpului;

– înălțimea minimă a corpului *(H_a)* se măsoară acolo unde înălțimea corpului este cea mai redusă (la extremitatea posterioară a pedunculului caudal);

– circumferința maximă a corpului *(C)* se măsoară la nivelul grosimii maxime şi înălțimii maxime;

– greutatea individuală *(g)* se determină prin cântărirea peştilor;

BCU "ASE" BUCUREŞTI UNIVERSITY LIBRARY

Indicii fenotipici menționați s-au determinat pe baza valorilor parametrilor fenotipici după cum urmează:

– *indicele de profil* = Ls / Hd ,

unde:
Ls = lungimea standard, în cm;
Hd = înălțimea maximă a corpului, în cm;

– *coeficientul Fulton* (de îngrășare):

$$\frac{g}{Ls^3} x100 ,$$

unde:
g = greutatea corpului, în g;
Ls = lungimea standard, în cm.

Pentru a obține informații cu privire la gradul de uniformitate a populației, precum și asupra nivelului de semnificație statistică a diferențelor dintre populațiile celor două specii, s-au efectuat măsurători biometrice la 50 exemplare/specie și s-au calculat valorile unor parametri statistici (Snedecor, 1968): $\bar{x}$ = media aritmetică; S = deviația standard; Es = eroarea standard; $C.V.$ % = coeficientul de variație.

1. Media aritmetică:

$$\bar{x} = \frac{\sum xi}{n} ,$$

unde:
Σxi = suma valorilor individuale;
n = numărul indivizilor.

2. Estimarea deviației standard pornind de la probă către populație

$$S = \sum x^2 - \frac{(\sum x)^2}{n} ,$$

unde:
Σx^2 = suma pătratelor valorilor individuale;
$(\Sigma x)^2$ = pătratul sumei valorilor individuale;
n = numărul indivizilor.

BCU IAȘI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

3. Eroarea standard:

$$S_{\bar{x}} = \sqrt{\frac{S^2}{n}} = \frac{S}{\sqrt{n}},$$

unde:
S^2=varianța

4. Coeficientul de variație:

$$C.V.\% = \frac{S \times 100}{\bar{x}},$$

unde:
S= deviația standard;
$\bar{x}$ = media aritmetică.

Pentru a stabili uniformitatea loturilor care au fost utilizate în experimentele ulterioare de extracție a ADN total şi de secvențiere, au fost folosiți câte 50 de indivizi aparținând celor două specii, pentru fiecare populație analizată.

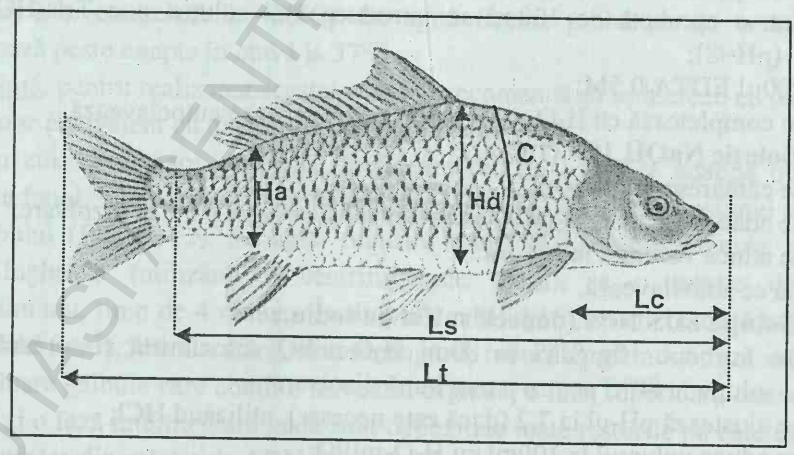


Figura 11. Diagrama măsurătorilor la indivizii studiați în vederea stabilirii uniformității loturilor (după Voican *et al.*, 1974, 1975)
Lt=lungime totală; **Ls**=lungime standard; **Lc**=lungimea capului;
Hd=înălțimea la nivelul înotătoarei dorsale;
Ha=înălțimea la extremitatea posterioară a pedunculului caudal; **C**=circumferința

BCU IAŞI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

4.2. PROTOCOLUL DE EXTRACȚIE AL ADN TOTAL

Tehnica este folosită pentru extragerea ADN total din țesuturi proaspete, congelate sau păstrate în etanol (Ausubel *et al.*, 1995). În vederea determinării cantităților totale de acizi nucleici şi a intervalelor de variabilitate ale acestui parametru pentru diferite țesuturi, au fost folosiți câte 20 de indivizi aparținând celor două specii.

Soluții:

1. Tampon pentru liza celulară:

Conține: Tris HCl 50mM (pH=8), SDS 1,0%, EDTA 25mM.

Pentru 50ml, într-o eprubetă se introduc 25ml H_2O miliQ (apă distilată filtrată prin filtru de carbon, schimbător de ioni etc.) autoclavată, la care se adaugă 2,5ml soluție stoc 1M Tris HCl (pH=8), 5ml 10% SDS, 2,5ml 0,5M EDTA. Se completează volumul cu H_2O miliQ până la 50ml şi se introduce într-un tub Corning nou cu volumul de 50ml, neautoclavat.

Soluții stoc (cantitățile sunt calculate pentru un volum de 100 ml):

1. Soluție Tris-HCl 1M (pH=8):;

– se dizolvă 12,11g Tris în 80ml H_2O miliQ;
– se corectează pH-ul la 8 cu HCl;
– se autoclavează.

2. Soluție Tris-EDTA (TE) (pH=8,0):

– într-o eprubetă de 100ml se introduce 1ml soluție stoc Tris-HCl 1M (pH=8);
– 200µl EDTA 0,5M;
– se completează cu H_2O-miliQ până la 100ml şi se autoclavează.

3. Soluție NaOH 10N (100ml):

– se cântăresc 40g NaOH;
– se adaugă 70ml H_2O-miliQ autoclavată şi se agită până la dizolvare;
– se aduce volumul la 100 ml;
– nu se autoclavează.

4. Soluție SDS 10% (dodecil sulfat de sodiu):

– se introduc 10g SDS în 80ml H_2O-miliQ autoclavată şi se încălzeşte soluția la 80°C pentru o mai bună dizolvare;
– se ajustează pH-ul la 7,2 (dacă este necesar), utilizând HCl;
– se aduce volumul la 100ml cu H_2O-miliQ;
– nu se autoclavează.

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

5. Soluție EDTA 0,5M (etilendiaminotetraacetat·sare disodică – Ref. SIGMA ED2SS):

– se cântăresc 18,61g EDTA, peste care se adaugă 80ml H_2O-miliQ;
– se agită puternic şi se adaugă 1ml soluție NaOH 10N;
– se adaugă NaOH până când soluția devine alcalină (pH=8), iar EDTA este dizolvat complet.
– se aduce volumul la 100ml cu H_2O-miliQ şi se autoclavează;

Modul de lucru:

Se etichetează tuburi Eppendorf de 1,5ml autoclavate, în care se introduc câte 500µl soluție tampon (tampon pentru liză). Tuburile se țin închise, până în momentul introducerii țesutului.

Se cântăresc 20 – 200mg de țesut muscular proaspăt, congelat sau conservat în alcool etilic 95% (în acest caz, țesutul se usucă înainte de cântărire, pe hârtie de filtru). Fragmentul de țesut se aşază pe o lamă sterilă şi se taie mărunt cu un bisturiu sau cu o lamă, sterilizate. Dacă fragmentul este mic (dacă provine de la un individ de 1 – 2cm), această etapă nu este necesară.

Se introduc fragmentele de țesut în tubul Eppendorf (de 1,5ml) corespunzător, care conține 500µl soluție tampon pentru liză. Această etapă se repetă pentru toți indivizii. În fiecare tub, se adaugă câte 10µl proteinază K (10µl reprezintă echivalentul a 200µg proteinază dintr-o soluție stoc 20mg/ml care este preparată şi congelată la –20°C). Se agită fiecare probă pe un vortex şi se păstrează peste noapte în etuvă la 37°C.

Notă: pentru realizarea acestei etape se recomandă să se lucreze cu un număr de probe echivalent cu numărul de cuve din centrifugă.

În ziua următoare, sub nişă, în fiecare tub de 1,5ml se adaugă 600µl de soluție fenol : cloroform : alcool izoamilic (25 : 24 : 1), până la semnul superior al tubului (Figura 12). Se agită tuburile timp de 30 – 60 secunde, apoi se centrifughează (utilizând o centrifugă de masă), la o turație de 8000 rotații/minut, timp de 4 minute. În timpul centrifugării, se etichetează noi tuburi Eppendorf de 1,5ml. La sfârşitul centrifugării, tuburile prezintă o fază inferioară de culoare gălbuie care conține solventul organic, o fază superioară care conține ADN şi o fază intermediară unde sunt depozitate toate resturile pe care dorim să le eliminăm din soluția de ADN (Figura 13).

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

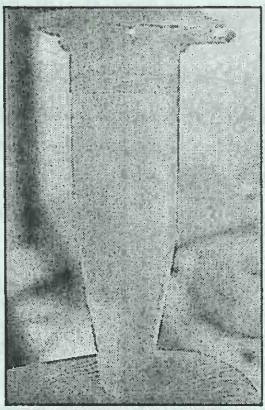


Figura 12. Țesut lizat amestecat cu fenol:cloroform:alcool izoamilic

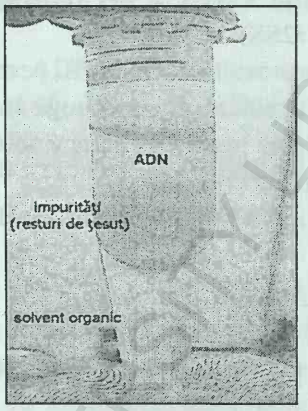


Figura 13. Identificarea celor trei faze la sfârșitul primei centrifugări

Notă: dacă această fază intermediară este foarte mare, se repetă spălarea cu fenol : cloroform : alcool izoamilic urmată de centrifugare. Dacă fazele sunt bine separate, se trece la etapa următoare.

Se separă faza superioară a fiecărui tub, în noile tuburi etichetate; pentru aceasta se utilizează o pipetă Gilson P-100, cu ajutorul căreia se extrag 700µl de ADN (Figura 14). Dacă pipetarea se face repede, iar concentrația ADN este foarte mare în faza superioară a tubului, în momentul pipetării, se pot extrage resturi ale fazei intermediare. Se extrage faza superioară din fiecare tub menținându-le deschise sub nișă, iar la sfârșit, se adaugă câte 550µl cloroform (Figura 15). Se agită tuburile timp de 30 – 60 secunde, apoi se centrifughează la 8000 rotații/minut, timp de 3 minute, utilizând o centrifugă de masă (tip COBOS MC-10). În timpul centrifugării, se etichetează noi tuburi.

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

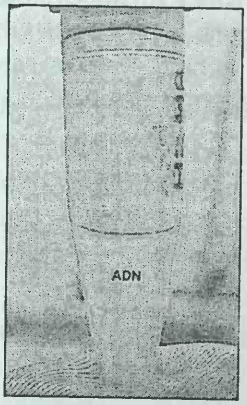


Figura 14. Prima fază de separare a ADN

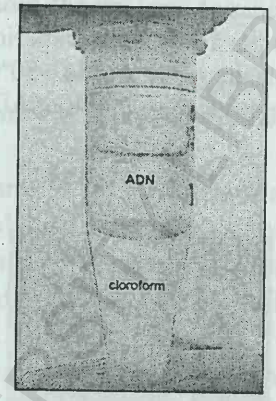


Figura 15. Faza de amestec cu cloroform

Se separă fazele superioare rezultate în urma centrifugării (Figura 16) în noile tuburi, în acelaşi mod ca în etapa precedentă (Figura 17), având grijă să nu se preia nimic din faza intermediară de separare.

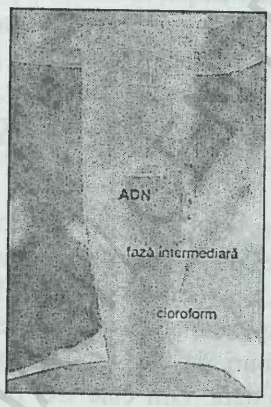


Figura 16. Identificarea celor trei faze la sfârşitul celei de-a 2-a centrifugări

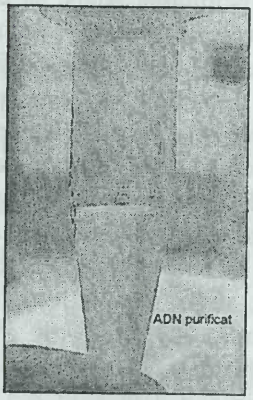


Figura 17. Separarea fazei superioare (ADN pur) în noile tuburi etichetate

BCU CLUJ RAU UNIVERSITY LIBRARY

Se adaugă 1ml etanol rece 95% (păstrat la –20°C) în noile tuburi după separare până la semnul superior al fiecărui tub (Figura 18). Se agită tuburile şi se lasă la temperatura de –20°C, timp de 30 – 60 minute, timp în care se va forma un precipitat albicios (ADN total) pe fundul tuburilor (Figura 19).

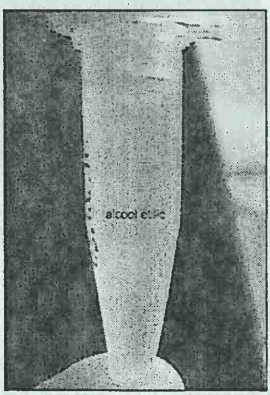


Figura 18. Precipitarea ADN cu alcool etilic absolut la –20°C

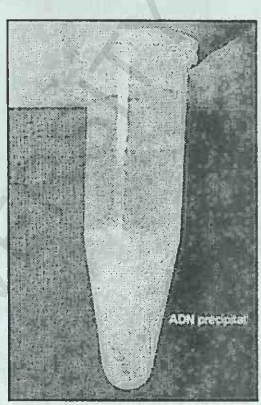


Figura 19. ADN precipitat

După precipitarea ADN, se centrifughează tuburile la 10.000 rotaţii/minut, timp de 5 minute, pentru sedimentare. Se elimină supernatantul şi se aşază tuburile deasupra unei hârtii de filtru, astfel încât să se scurgă ultimele picături de alcool. Urmează uscarea peletelor, mutând tuburile, deschise, într-o centrifugă cu vacuum, unde sunt menţinute timp de 10 minute, cu temperatura în scădere. Dacă în acest interval de timp sedimentele nu sunt uscate, se mai lasă tuburile încă 5 minute în centrifugă.

După uscarea peletelor, se adaugă în fiecare tub câte 200µl soluţie TE (pH=8,0) şi se resuspendă manual sau pipetând de câteva ori. Pentru o mai bună resuspensie, se pot lăsa între 15 şi 30 minute la temperatura camerei, la 37°C, sau timp mai îndelungat la 4°C. După resuspendarea peletelor de ADN, conţinutul fiecărui tub este repartizat în trei tuburi de câte 1,5ml (etichetate anterior), punând câte 50µl din soluţia resuspendată. Din cele trei tuburi ale unei probe, unul se păstrează la 4°C, iar celelalte două se congelează (–20°C - –80°C).

BCU CLUJ CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

4.2.1. PRELUCRAREA STATISTICĂ A DATELOR OBŢINUTE DIN EXTRACŢIA ADN

4.2.1.1. Estimarea valorilor medii ale populaţiilor şi stabilirea intervalelor de variabilitate

Folosind valorile mediei $(\bar{x})$ şi deviaţiei standard *(S)* (conform formulelor prezentate anterior), calculate pe baza probelor dintr-o populaţie, se pot estima valorile corespunzătoare pentru întreaga populaţie (sau specie). Estimarea mediei populaţiei implică calculul erorii standard a mediei $(S_{\bar{x}})$, care ţine cont de variabilitatea şi mărimea probei (Varvara *et al.*, 2001).

Se caută o valoare critică pentru un anumit grad de confidenţă α şi un anumit număr de grade de libertate *t(α, t-1)*; atunci, probabilitatea estimării va fi dată de *1-α*, adică *α=0,05*. Valoarea lui *t* reprezintă valoarea critică a distribuţiei *t* pentru un anumit nivel de confidenţă sau prag de semnificaţie α şi *n-1* grade de libertate. Pragul de semnificaţie reprezintă probabilitatea aleasă arbitrar, ca intervalul de confidenţă calculat să cuprindă media populaţiei. Pentru majoritatea studiilor, probabilitatea de 95%, adică *α=0,05*, este considerată satisfăcătoare.

Eroarea standard a mediei este folosită pentru a calcula intervalul de confidenţă a mediei populaţiei, interval care să cuprindă, cu o anumită probabilitate, media populaţiei.

$\mu = \bar{x} \pm t(\alpha, n-1) \cdot S_{\bar{x}}$, unde μ reprezintă media populaţiei, iar $\bar{x}$ valorile medii ale probelor.

Limitele intervalului: limita inferioară *(LI)* şi limita superioară *(LS)*, sunt date de formulele:

$$LI = \bar{x} - S_{\bar{x}} \cdot t(\alpha, n-1)$$
$$LS = \bar{x} + S_{\bar{x}} \cdot t(\alpha, n-1)$$

Astfel, intervalul LI-LS include media populaţiei cu o probabilitate de *1-α*.

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

4.2.1.2. Compararea mai multor probe

ANOVA model I bifactorial cu număr egal de observaţii în celulă

Acest model se foloseşte în condiţii asemănătoare cu modelul bifactorial cu o observaţie în celulă la care se adaugă interacţiunea dintre factori. Evidenţierea interacţiunii poate fi sugerată de reprezentarea grafică a mediilor probelor urmărite.

Observaţia în acest caz este egală cu media generală + efectul nivelului *„i"* al factorului *A* + efectul nivelului *„j"* al factorului *B* + interacţiunea *AiBj* + eroarea întâmplătoare (Fowler *et al.*, 2000).

		Ai	
		A1	A2
Bj	B1	- - - - $\bar{x}$	- - - - $\bar{x}$
	B2	- - - - $\bar{x}$	- - - - $\bar{x}$

În fiecare celulă trebuie să avem un număr egal de observaţii

$$S_t^2 = S_{ext}^2 + S_{int}^2$$
$$S_{ext}^2 = S_c^2 + S_r^2 + S_i^2$$
$$S_t^2 = S_c^2 + S_r^2 + S_i^2 + S_{int}^2$$

unde: S_i^2 = varianţa interacţiunii; S_{ext}^2 = varianţa externă; S_t^2 = varianţa totală

Se stabilesc ipotezele modelului:

H_{01}: $\mu_{A1}=\mu_{A2}=\mu_{An}$ H_{11}: $\mu_{A1}\neq\mu_{A2}\neq\mu_{An}$

H_{02}: $\mu_{B1}=\mu_{B2}=\mu_{Bn}$ H_{12}: $\mu_{B1}\neq\mu_{B2}\neq\mu_{Bn}$

H_{03}: interacţiunea=0 H_{13}: interacţiunea≠0

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

$S^2 = \overline{SS} = \frac{SS}{grade \quad libertate}$, SS = suma de pătrate; $\overline{SS}$ = suma de pătrate medie;

$SS_t = \sum x_t^2 - \frac{\left(\sum x_t\right)^2}{n_t}$, SS_i = suma de pătrate a interacţiunii

$SS_{ext} = SS_c + SS_r + SS_i$,

$SS_c = \sum\left[\frac{\left(\sum x_c\right)^2}{n_t r}\right] - \frac{\left(\sum x_t\right)^2}{n_t}$

$SS_r = \sum\left[\frac{\left(\sum x_r\right)^2}{n_t c}\right] - \frac{\left(\sum x_t\right)^2}{n_t}$

$SS_i = \frac{\left(\sum x_{c1r1}\right)^2}{n_{c1r1}} + \frac{\left(\sum x_{c1r2}\right)^2}{n_{c1r2}} + \frac{\left(\sum x_{c2r1}\right)^2}{n_{c2r1}} + \frac{\left(\sum x_{c2r2}\right)^2}{n_{c2r2}} - \frac{\left(\sum x_t\right)^2}{n_t} - SS_c - SS_r$

$SS_{int} = SS_t - SS_c - SS_r - SS_i$

$gl_t = n_t - 1$, gl_t=grade de libertate totale, n_t=număr total de valori;
$gl_c = c - 1$, gl_c=grade de libertate pe coloane, c=număr de valori pe coloane;
$gl_r = r - 1$, gl_r=grade de libertate pe rânduri, r=număr de valori pe rânduri;
$gl_i = (c-1)(r-1)$, gl_i=grade de libertate ale interacţiunii;
$gl_{int} = n_t - cr$, gl_{int}=grade de libertate interne.

Tabel sintetic al valorilor calculate pentru testul ANOVA

Sursa de variabilitate	SS	Grade de libertate	$\overline{SS}$	F
c	SS_c	c - 1	SS_c / c - 1	$\overline{SS}_c / \overline{SS}_{int}$
r	SS_r	r - 1	SS_r / r - 1	$\overline{SS}_r / \overline{SS}_{int}$
i	SS_i	(c-1)(r-1)	SS_i /(c - 1)(r - 1)	$\overline{SS}_i / \overline{SS}_{int}$
int	SS_{int}	n_t - cr	SS_{int} / n_t - cr	
t	SS_t	n_t - 1		

BCU IAŞI / CETIT UNIVERSITY LIBRARY

Dacă: $F_c \geq F(\alpha, c-1, g.l._{int}) \Rightarrow H_{01}$ (F), H_{11} (A)
$F_r \geq F(\alpha, r-1, g.l._{int}) \Rightarrow H_{02}$ (F), H_{12} (A)
$F_i \geq F(\alpha, (c-1)(r-1), g.l._{int}) \Rightarrow H_{03}$ (F), H_{13} (A)

4.3. REACŢIA DE AMPLIFICARE GENICĂ PRIN POLIMERIZARE ÎN LANŢ (PCR)

4.3.1. PRINCIPII GENERALE

Majoritatea polimerazelor recunosc ADN monocatenar ca fiind un posibil model de amplificare şi se leagă temporar la acest lanţ, pentru formarea unei duble catene. De asemenea, polimerazele se leagă şi de deoxinucleotidtrifosfaţii (dNTPs) valabili în mediu şi folosind energia înmagazinată în legăturile triple, catalizează reacţia de ataşare a nucleotidelor la a doua catenă de ADN; apoi enzima se mută la sfârşitul porţiunii unde catena este dublă, iar procesul este repetat de sute sau mii de ori pe secundă.

ADN polimeraza acţionează unidirecţional; începe să acţioneze de la capătul 3` al porţiunii dublucatenare, sinteza decurgând în direcţia 5`→3`. Astfel, polimeraza poate începe să acţioneze oriunde găseşte o joncţiune de tip ADN monocatenar – bicatenar. Pentru direcţionarea începutului sintezei unui anumit segment de ADN, este necesar un scurt segment oligonucleotidic (un mic număr de nucleotide unite într-un lanţ scurt complementar unei secvenţe de ADN) poziţionat chiar deasupra porţiunii dorite pentru sinteză (Prescott şi Harley, 1999).

Acest fragment oligonucleotidic nu se poate alinia la ADN dublu catenar, în schimb, se leagă imediat la secvenţa complementară a ADN monocatenar. Prin încălzire, legăturile dintre cele două catene ale ADN se rup, formându-se porţiuni monocatenare. Prin urmare, denaturarea ADN prin căldură, urmată de o uşoară răcire, în prezenţa oligonucleotidelor complementare, determină alinierea acestora la macromolecula de ADN monocatenar, oriunde întâlnesc secvenţe similare complementare (Palumbi, 1996; Monod şi Francois, 1996; Lisker şi Armendares, 2000; Mas Eva *et al.*, 2001).

BCU IAŞI - CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

4.3.2. CICLURILE DE REPLICARE

Replicarea în PCR constă în trei faze mai importante: denaturare, aliniere şi extensie.

4.3.2.1. Denaturarea

În această fază, căldura este folosită în scopul opririi tuturor reacţiilor enzimatice şi denaturării ADN de la dublu catenar la monocatenar. De obicei, se foloseşte o temperatură de 94°C sau, după metode mai noi 92°C. O temperatură prea joasă sau un timp de denaturare prea scurt pot fi ineficiente, rămânând porţiuni de ADN bicatenar. Cu toate că *Taq* polimeraza este rezistentă la denaturarea termică, nu este totuşi imună la acţiunea căldurii, o încălzire excesivă ducând la o scădere a activităţii enzimatice. De exemplu, după 30 cicluri de replicare cu incubare la 94°C pentru 60 de minute, activitatea enzimei se reduce la jumătate.

4.3.2.2. Alinierea primerilor

În această fază, temperatura este mai joasă, astfel încât primerii oligonucleotidici se pot lega în zonele complementare din catena de ADN. Aceasta este faza critică a reacţiei de amplificare, deoarece dacă primerii se leagă corect doar în zona ţintă (zona care urmează a fi amplificată), atunci există o probabilitate suficient de mare să se obţină produşi de calitate.

Alinierea este un proces randomic, care depinde de concentraţia primerilor, disponibilitatea siturilor de legătură şi de prezenţa zonelor cu similaritate scăzută cu secvenţa primerilor, care duc la alinieri nespecifice. Trebuie remarcat şi faptul că, dacă macromolecula de ADN care foloseşte drept matriţă este fragmentată, atunci, mici fragmente din aceasta pot acţiona ca primeri, fiecare având o ţintă precisă în cadrul genomului. Acesta este un motiv pentru care molecule de ADN cu greutate moleculară mare şi molecule mici nu trebuie amestecate ca matriţe pentru viitoare amplificări (Palumbi, 1996).

O temperatură mare de aliniere a primerilor sau o concentraţie mare a acestora în mediul de reacţie pot determina o blocare a formării legăturilor şi implicit de aliniere a primerilor cu matriţa de ADN. O temperatură joasă determină o aliniere nespecifică a primerilor în diferite porţiuni care prezintă o complementaritate scăzută, generându-se astfel numeroase artefacte. Dacă temperatura de aliniere este foarte scăzută, catenele de ADN se vor „realinia" formând structura iniţială – ADN dublu catenar.

BUCHAREST UNIVERSITY LIBRARY

Timpul de aliniere a primerilor constituie de asemenea o problemă foarte importantă pentru obținerea unui produs bun. Astfel, un timp de aliniere foarte lung permite primerilor să găsească noi posibile situri de legătură şi să se alinieze nespecific. Cu toate acestea, un timp scurt de aliniere poate determina o mare specificitate de aliniere în PCR. În general, timpul de aliniere este de 30 – 60 secunde, dar poate funcționa la fel de bine şi un timp mai scurt de 15 secunde la temperaturi mari de aliniere cu primeri specifici.

4.3.2.3. Extensia

Faza de extensie sau elongare determină activitatea enzimatică şi sinteza segmentului de ADN. *Taq* polimeraza funcționează de obicei bine la 72°C, aceasta fiind şi temperatura utilizată de obicei pentru această etapă. Enzima se activează şi îşi începe activitatea la temperaturi scăzute, ceea ce este foarte important pentru succesul reacției de amplificare. Majoritatea primerilor au o temperatură de aliniere mai mică de 72°C, astfel încât majoritatea vor fi foarte slab legați de secvența țintă, odată cu creşterea temperaturii de extensie. Odată cu creşterea temperaturii de la temperatura de aliniere către 72°C, începe şi reacția de polimerizare, dar destul de lent. Oricum, această reacție de polimerizare este suficientă pentru a adăuga câteva extra-baze, crescând astfel stabilitatea complexului primer – matriță. Astfel, odată cu trecerea timpului (de obicei 30 de secunde), temperatura de extensie creşte, primerul fiind deja parte componentă a noii catene de ADN.

Timpul de extensie este o altă variabilă importantă. În condiții optime, *Taq* poate lega mii de nucleotide pe minut. Prin urmare, produşii PCR cu o lungime mai mică de 500 perechi de baze (pb) nu necesită mult timp pentru o sinteză completă (aproximativ 30 de secunde fiind suficiente). În general, un timp de extensie de 30 de secunde este suficient pentru produşi sub 50pb, pentru produşi cu lungimi cuprinse între 500 şi 1500pb sunt necesare 60 de secunde, iar pentru produşi cu lungimi mai mari sunt necesare 90 de secunde. Optimizarea timpului de elongare este necesară, deoarece un timp prea mare poate favoriza apariția de artefacte (alinieri nespecifice) (Palumbi, 1996).

4.3.2.4. Condițiile de reacție

Pentru sistematica moleculară, atenția a fost îndreptată către primeri şi către buna lor aliniere la matrița de ADN. Dacă alinierea nu este eficientă sau dacă primerii se aliniază nespecific, amplificarea poate să fie blocată sau se pot amplifica produşi alternativi. Astfel, complementaritatea perfectă primer –

matriță poate determina amplificări cu mare specificitate. Din păcate, temperaturile ridicate împiedică adesea utilizarea primerilor universali (primeri realizați spre a fi eficienți pentru un anumit număr de taxoni) (Kocher *et al.*, 1989).

4.3.3. COMPONENTELE PCR

Mediul de reacție este foarte important pentru specificitatea şi eficiența amplificării. Astfel, mediul de reacție trebuie să conțină un tampon, amestecul de nucleotide, polimerază, primeri, ADN şi Mg^{2+} (un cofactor necesar pentru activitatea enzimei) (Carbonari *et al.*, 1993). Numai primerii şi nucleotidele se consumă în cursul reacției, acestea fiind adăugate în exces, astfel încât sinteza să nu poată fi limitată de aceste componente.

Cofactorul nu se consumă în timpul reacției şi nici nu este degradat de temperaturile extreme ale ciclurilor de amplificare, astfel încât concentrațiile inițiale şi finale sunt aceleaşi. Ionul este un important cofactor în cataliza enzimatică a reacției de sinteză; astfel, o concentrație optimă poate accelera considerabil desfăşurarea reacției. Oricum, Mg^{2+} interacționează cu sarcinile negative ale grupărilor fosfat ale nucleotidelor, suficient de puternic încât Mg^{2+} să atragă grupările PO^{4-} şi să rămână în cantitate destul de mică pentru a mai reacționa ca un cofactor. Din acest motiv, concentrația de Mg^{2+} trebuie să fie mai mare decât concentrația dNTP.

Varierea concentrației de Mg^{2+} este una dintre cele mai comune metode de stabilire a condițiilor de reacție pentru PCR. De obicei se utilizează o cantitate de 1,5mM $MgCl_2$.

4.3.4. AMPLIFICAREA GENICĂ LA CARASSIUS GIBELIO BLOCH ŞI CYPRINUS CARPIO L

În cazul celor două specii analizate, a indivizilor ginogenetici şi a hibrizilor interspecifici, au fost amplificate 3 secvențe aparținând la trei gene diferite. Astfel, au fost amplificate regiunile cu hipervariabilitate aparținând citocromului b şi regiunii de control a ADNmt (D-loop), precum şi o regiune conservativă necodificatoare la speciile analizate, segmentul 4L al dehidrogenazei (ND4L) (Figura 20).

BCU "I. CENTRAN" UNIVERSITY LIBRARY

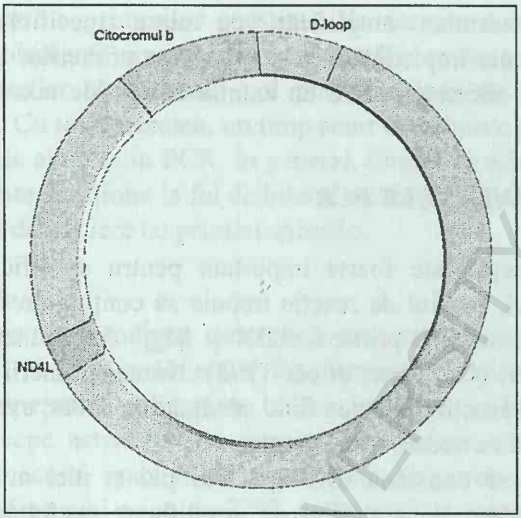


Figura 20. Localizarea genelor amplificate, la toţi indivizii studiaţi

4.3.4.1. Amplificarea genei care determină sinteza citocromului

În cazul speciilor analizate, a fost amplificat citocromul b diferenţiat, in funcţie de primerii utilizaţi şi condiţiile de reacţie specifice. La *Cyprinus carpio* L şi hibrizii intraspecifici analizaţi, datorită lungimii mari a acestei gene, de aproximativ 1140pb, a fost necesară amplificarea în două etape, pe secvenţe diferite, utilizându-se două perechi de primeri (Figurile 21 şi 22).

H15149	5`-AAACTGCAGCCCTCAGAATGATATTTGTCCTCA-3`	Primerii pentru primul segment
L14724	5`-CGAAGCTTGATATGAAAAACCATCGTTG-3`	
H15910	5`-ATCTTCGGTTTACAAGACCGGT-3`	Primerii pentru al doilea segment
L15138	5`-ATGATGACCGCCTTCGTAGGCTA-3`	

Figura 21. Primerii utilizaţi pentru amplificarea citocromului b, la *Cyprinus carpio*

BCU IAŞI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

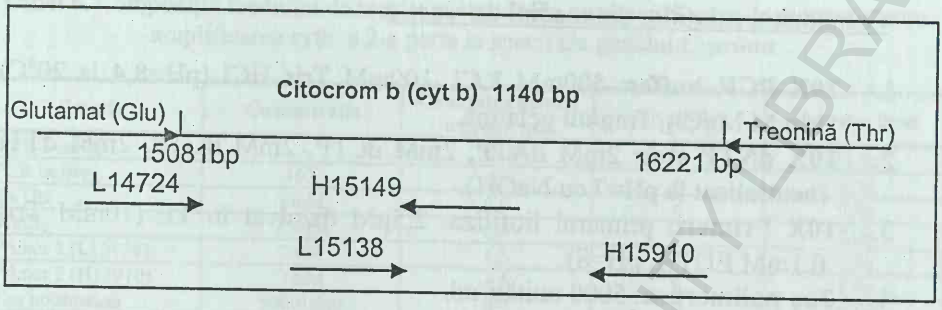


Figura 22. Poziția primerilor utilizați pentru amplificarea genei la *Cyprinus carpio* L. şi hibrizii intraspecifici

Pentru prima parte a citocromului b, în cazul tuturor indivizilor aparținând genului *Cyprinus*, a fost folosit același mediu de reacție, precum şi aceleaşi condiții de amplificare. Referitor la mediul de reacție, prepararea acestuia se realizează într-un tub Eppendorf steril de 1,5ml, în care se adaugă toate componentele utilizate în amplificare, ținând cont de cantitățile necesare corelate cu numărul de probe plus 2 (pentru controlul negativ şi o rezervă de reactivi). Astfel, se înmulțesc cantitățile necesare cu numărul de probe (Tabelul 5). Controlul negativ (C-) conține în toate cazurile același mediu de reacție utilizat pentru toate celelalte probe, exceptând ADN folosit drept matriță pentru amplificare, înlocuit în acest caz cu H_2O miliQ (apă bidistilată, filtrată prin filtru de carbon şi schimbător de ioni). Este utilizat pentru decelarea eventualelor contaminări ale mediului de reacție.

Primerii utilizați pentru amplificarea primului segment sunt L14724 (Pääbo, 1990) pentru catena directă şi H15149 (Kocher *et al.*, 1989)

Tabel 5. Compoziția mediului de reacție şi cantitățile corespunzătoare de reactivi pentru amplificarea primei părți a cytb la specii ale genului *Cyprinus*

Reactiv	Concentrația	Cantitatea pentru o probă (µl)	Nr. probe	Amestec final
ddH_2O-miliQ	-	33,2	n	33,2n
PCR buffer	10X	4,5	n	4,5n
dNTPs	8Mm	5,0	n	5,0n
$MgCl_2$	25mM	2,0	n	2,0n
Primer 1 (L14724)	2mM	1,5	n	1,5n
Primer 2 (H15149)	2mM	1,5	n	1,5n
Taq polimeraza	5000U/ml	0,3	n	0,3n

BUCUREŞTI UNIVERSITY LIBRARY

Compoziţia soluţiilor din mediul de reacţie:

1. **10X PCR buffer**: 500mM KCl, 100mM Tris HCl (pH=8,4 la 20°C), 15mM $MgCl_2$, 1mg/ml gelatină.
2. **10X dNTP stoc**: 2mM dATP, 2mM dCTP, 2mM dGTP, 2mM dTTP (neutralizat la pH=7 cu NaOH).
3. **10X Primeri**: primerul liofilizat 2,5µM dizolvat în TE (10mM Tris, 0,1mM EDTA, pH=8).
4. ***Taq* polimeraza**: 5000 unităţi/ml.

Procesul de amplificare a primei părţi a citocromului b a urmat acelaşi program pentru toate probele analizate aparţinând genului *Cyprinus* (Figura 23), având o temperatură de aliniere a primerilor de 45°C timp de 1 minut şi 30 cicluri de replicare.

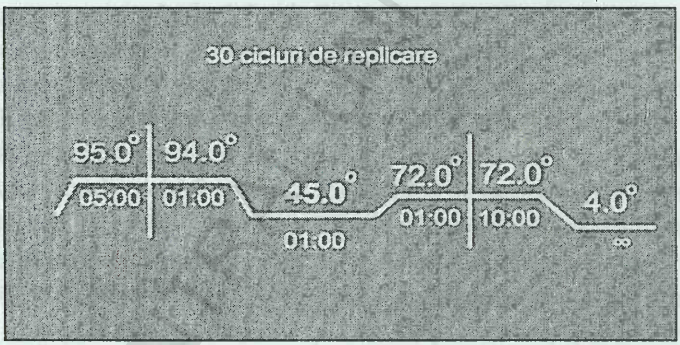


Figura 23. Reprezentarea grafică a etapelor PCR pentru prima parte a cytb la specii aparţinând genului *Cyprinus*

Pentru al doilea segment al citocromului b în cazul speciilor şi hibrizilor aceluiaşi gen – *Cyprinus*, au fost efectuate modificări ale temperaturii de aliniere a primerilor (pentru mărirea procentului de amplificări specifice), care a fost ridicată la 50°C, timp de 1 minut, întregul proces având 30 cicluri de replicare (Figura 24). De asemenea, au fost schimbaţi primerii, în acest caz utilizându-se L15138 (Chang *et al.*, 1994) pentru catena directă şi H15910 (Chang *et al.*, 1994; Tatsuo *et al.*, 2004) pentru catena complementară (Tabel 6).

Tabel 6. Compoziția mediului de reacție şi cantitățile corespunzătoare de reactivi pentru amplificarea cytb a 2-a parte la specii ale genului *Cyprinus*

Reactiv	Concentrația	Cantitatea pentru o probă (µl)	Nr. probe	Amestec final
ddH_2O-miliQ	-	33,2	n	33,2n
PCR buffer	10X	4,5	n	4,5n
dNTPs	8mM	5,0	n	5,0n
$MgCl_2$	25mM	2,0	n	2,0n
Primer 1 (L15138)	2mM	1,5	n	1,5n
Primer 2 (H15910)	2mM	1,5	n	1,5n
Taq polimeraza	5000U/ml	0,3	n	0,3n

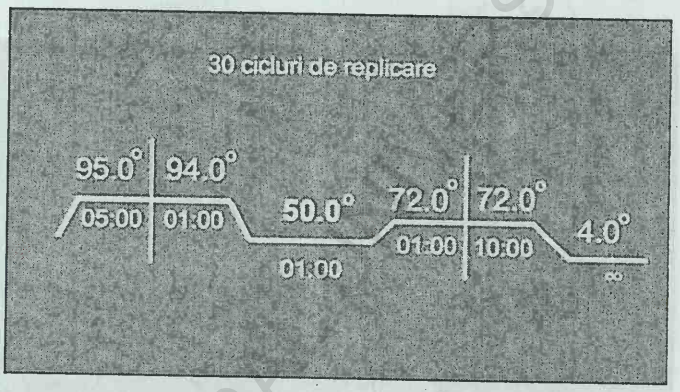


Figura 24. Reprezentarea grafică a etapelor PCR pentru partea a 2-a a cytb la specii aparținând genului *Cyprinus*

În cazul speciilor genului *Carassius*, amplificarea citocromului b s-a desfăşurat într-o singură etapă, datorită imperfecțiunii de amplificare a primerilor intermediari. Astfel, pentru specificitatea amplificării şi pentru a mări cantitatea de produs obținut, a fost modificată cantitatea de *Taq* polimerază din amestecul de reacție de la 0,3µl la 0,5µl (Tabelul 7), iar numărul de cicluri a fost modificat la 40 etape de amplificare (Figura 25). Primerii utilizați pentru amplificarea acestui fragment sunt Glu-F şi Thr-R (Zardoya şi Doadrio, 1998), având ca regiuni complementare secvențe nucleotidice din afara citocromului b şi anume genele care codifică sinteza acidului glutamic (Glu) şi a treoninei (Thr) (Figura 26).

BCU ... LIBRARY

Tabel 7. Compoziţia mediului de reacţie şi cantităţile corespunzătoare de reactivi pentru amplificarea cytb la specii ale genului *Carassius*

Reactiv	Concentraţia	Cantitatea pentru o probă (µl)	Nr. probe	Amestec final
ddH_2O-miliQ	-	33	n	33n
PCR buffer	10X	4,5	n	4,5n
dNTPs	8mM	5,0	n	5,0n
$MgCl_2$	25mM	2,0	n	2,0n
Primer 1 (Glu-F)	2mM	1,5	n	1,5n
Primer 2 (Thr-R)	2mM	1,5	n	1,5n
Taq polimeraza	5000U/ml	0,5	n	0,5n

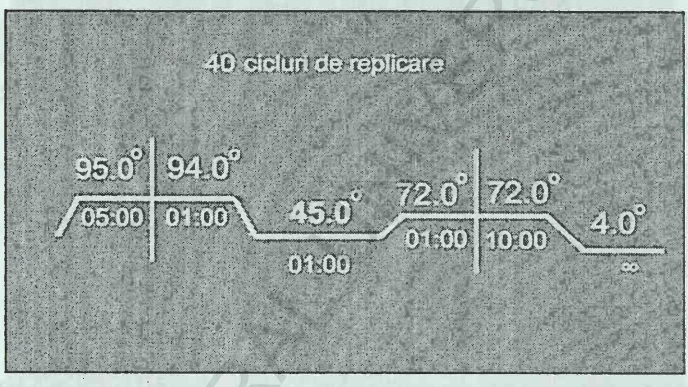


Figura 25. Reprezentarea grafică a etapelor PCR pentru citocromul b la specii aparţinând genului *Carassius*

Glu-F 5`-GAAGAACCACCGTTGTTATTCAA-3`
Thr-R 5`-ACCTCCRATCTYCGGAGGACA-3`

Figura 26. Structura primerilor utilizaţi în amplificarea cytb la *Carassius gibelio* Bloch.

4.3.4.2. Amplificarea regiunii de control mitocondrial la Carassius Gibelio Bloch şi Cyprinus Carpio L.

Replicarea ADNmt este iniţiată pe o singură catenă, în interiorul regiunii de control (regiune necodificatoare). Pe măsură ce această catenă îşi sintetizează catena complementară, cealaltă catenă a duplexului iniţial este liberă, formând o

buclă monocatenară numită **D-loop** (engl. *displacement loop*). Când replicarea a avansat pentru aproximativ două treimi din suprafaţa moleculei, este iniţiată replicarea şi la nivelul buclei, până când se va forma un nou genom circular bicatenar (Figura 27) (Clayton, 1982; Abilock şi Stephenson, 2001).

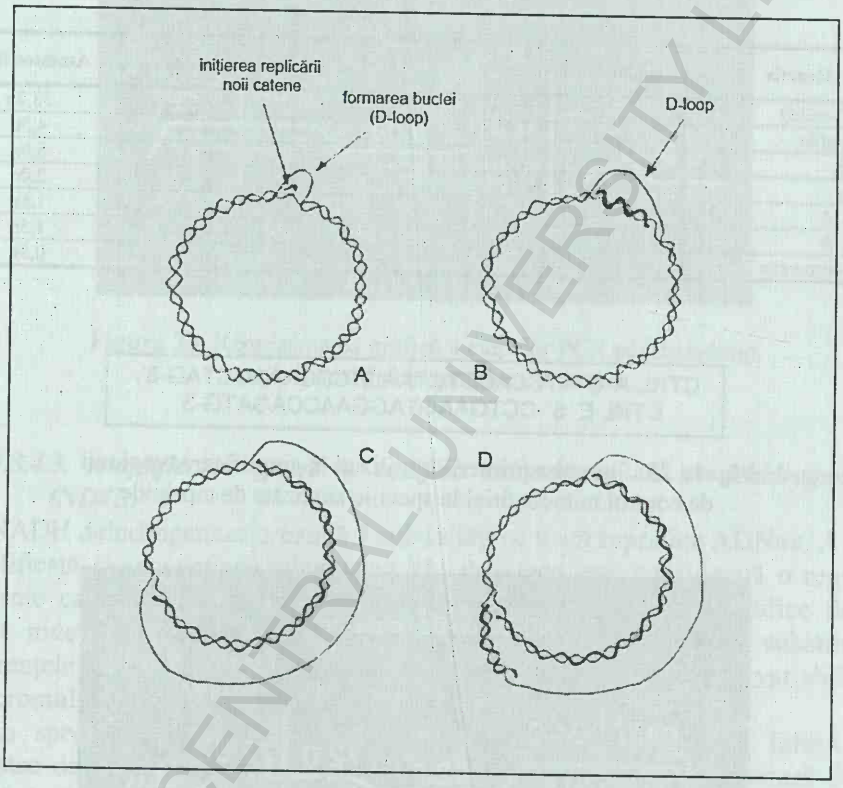


Figura 27. Poziţia D-loop în cadrul genomului mitocondrial (după Abilock şi Stephenson, 2001)

În cazul speciei *Cyprinus carpio* L. şi al varietăţii crap-oglindă, a fost folosit un mediu de reacţie standard (Tabel 8) şi primeri universali specifici regiunii de control mitocondrial control A pentru catena directă şi control E pentru catena reversă (Figura 28). Reacţia de amplificare a decurs după un program a cărui temperatură de aliniere a primerilor a fost de 62°C, la un număr de 40 cicluri de amplificare (Figura 29). Temperatura ridicată utilizată pentru alinierea primerilor s-a datorat dificultăţilor de amplificare, provocate de alinierile imperfecte

BCU CLUJ / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

concretizate în benzi multiple; prin mărirea temperaturii, se măreşte specificitatea alinierilor.

Tabel 8. Compoziţia mediului de reacţie şi cantităţile corespunzătoare de reactivi pentru amplificarea d-loop

Reactiv	Concentraţia	Cantitatea pentru o probă (µl)	Nr. probe	Amestec final
ddH_2O-miliQ	-	33,2	n	33,2n
PCR buffer	10X	4,5	n	4,5n
dNTPs	8mM	5,0	n	5,0n
$MgCl_2$	25mM	2,0	n	2,0n
CTRL A	2mM	1,5	n	1,5n
CTRL E	2mM	1,5	n	1,5n
Taq polimeraza	5000U/ml	0,3	n	0,3n

CTRL A 5`-TTCCACCTCTAACTCCCAAAGCTAG-3`
CTRL E 5`-CCTGAAGTAGGAACCAGATG-3`

Figura 28. Structura primerilor utilizaţi în amplificarea regiunii de control mitocondrial la speciile analizate de ciprinide

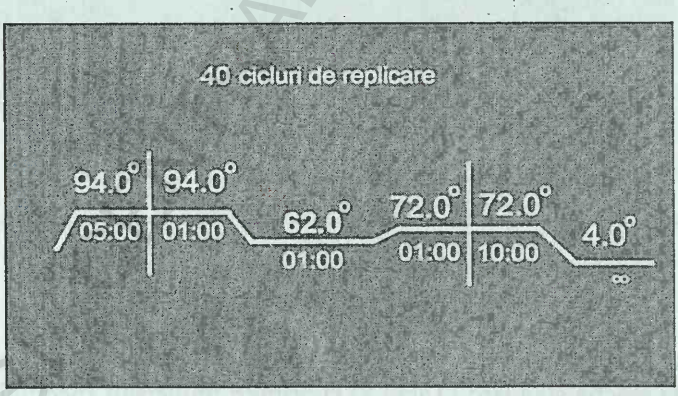


Figura 29. Reprezentarea grafică a etapelor PCR pentru d-loop la specii aparţinând genului *Cyprinus*

Pentru specii aparţinând genului *Carassius*, a fost utilizat acelaşi mediu de reacţie şi aceiaşi primeri ca în cazul speciilor genului *Cyprinus*. Referitor la

parametrii programului de amplificare, acesta s-a desfăşurat la o temperatură de aliniere a primerilor de 60°C şi 30 cicluri de replicare (Figura 30).

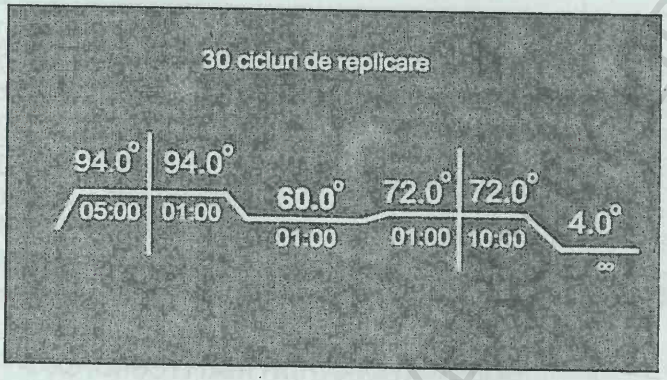


Figura 30. Reprezentarea grafică a etapelor PCR pentru d-loop la specii aparţinând genului *Carassius*

4.3.4.3. Amplificarea genei ce codifică subunitatea 4L al dehidrogenazei (ND4L)

NADH dehidrogenaza prezintă 7 subunităţi pe toată suprafaţa ADNmt. A fost amplificată şi secvenţiată subunitatea 4L, deoarece este considerată o regiune puternic conservativă, astfel încât eventualele substituţii nucleotidice de la acest nivel ne vor putea confirma (în cazul apariţiei acestor substituţii) diferenţele decelate în cadrul celorlalte gene secvenţiate, hipervariabile – citocromul b şi d-loop.

La speciile genului *Cyprinus,* pentru amplificarea genei s-a folosit un amestec de reacţie modificat prin dublarea cantităţii de *Taq* polimerază de la 0,3µl, la 0,6µl (Tabelul 9). Pentru amplificarea segmentului dorit, s-au folosit doi primeri degeneraţi L10420 pentru catena directă şi H10720 pentru reversă (Figura 31).

Reacţia de amplificare a genei s-a desfăşurat după un program care avea temperatura de aliniere a primerilor de 51°C şi un număr de 40 cicluri de replicare (Figura 32).

În cazul speciilor genului *Carassius*, pentru amplificarea genei codificatoare a ND4L a fost folosit acelaşi mediu de reacţie (inclusiv aceiaşi primeri) şi aceleaşi condiţii de amplificare ale programului PCR ca în cazul speciilor genului *Cyprinus* (Figura 32).

Tabel 9. Compoziția mediului de reacție și cantitățile corespunzătoare de reactivi pentru amplificarea ND4L

Reactiv	Concentrația	Cantitatea pentru o probă (µl)	Nr. probe	Amestec final
ddH_2O-miliQ	-	31,9	n	31,9n
PCR buffer	10X	4,5	n	4,5n
dNTPs	8mM	5,0	n	5,0n
$MgCl_2$	25mM	2,0	n	2,0n
CTRL A	2mM	1,5	n	1,5n
CTRL E	2mM	1,5	n	1,5n
Taq polimeraza	5000U/ml	0,6	n	0,6n

L10420 5`-AAYAARAYCNTTGATTTCGRCTCA-3`
H10720 5`-TCYGTGCCRTGYGTYCGNGC-3`

Figura 31. Structura primerilor utilizați în amplificarea ND4L la ciprinide

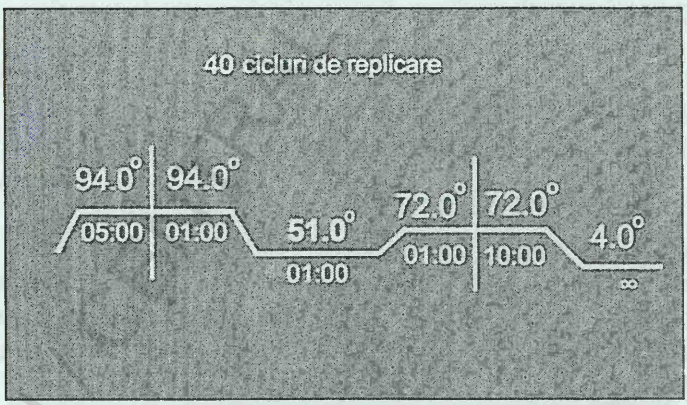


Figura 32. Reprezentarea grafică a etapelor PCR pentru ND4L

BCU IAȘI UNIVERSITY LIBRARY

4.4. TESTAREA PRODUŞILOR PCR PRIN ELECTROFOREZĂ ÎN GEL DE AGAROZĂ

La sfârşitul fiecărei reacţii de amplificare, este necesară o verificare a produşilor obţinuţi pentru a observa dacă a avut loc amplificarea, dacă au avut loc amplificări multiple sau pentru decelarea eventualelor contaminări.

Soluţii necesare:

– agaroză SEAKEM;

– tampon TBE: soluţie stoc 10X (108g Tris base, 55g acid boric, 40ml 0,5M EDTA (pH=8,0), se completează cu apă bidistilată până la 1l) şi 1X soluţie de lucru (89mM Trios base, 89mM acid boric, 2mM EDTA);

– loading buffer: 20% glicerol, 1mg/ml bromfenol albastru, 1mg/ml xilencianol;

– soluţie bromură de etidiu: pentru 1000X soluţie stoc, cu o concentraţie 0,5mg/ml sunt necesare: 50mg bromură de etidiu, 100ml H_2O bidistilată. Se diluează soluţia stoc în proporţie 1:1000.

– marker molecular de 100pb

Concentraţia gelului de agaroză depinde de mărimea fragmentelor de ADN care urmează a fi evidenţiate prin electroforeză (Tabelul10) (Ausubel *et al.*, 1992).

Tabel 10. Concentraţia gelului de agaroză corelată cu mărimea fragmentului de ADN

Concentaţia gelului de agaroză (%)	Lungimea fragmentului de ADN (kb)
0,5	1 – 30
0,7	0,8 – 12
1,0	0,5 – 10
1,2	0,4 – 7
1,5	0,2 – 3

Având valori aproximative ale lungimilor genelor amplificate (valori provenite din banca de gene – GenBank), pentru verificarea produşilor PCR au fost folosit geluri de agaroză având concentraţii de 1,5% şi volume de 30ml. Prepararea unui astfel de gel necesită o cantitate de 0,45g agaroză (SEAKEM) la 30ml TBE 1X. Astfel, se adaugă soluţia de TBE 1X peste agaroză, se amestecă până la omogenizare şi se introduce în cuptorul cu microunde pentru aproximativ 20 de secunde. După expirarea timpului, se scoate, se agită şi se reintroduce în cuptor pentru alte 20 de secunde. Flaconul ce conţine gelul se

BCU / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

răceşte în jet de apă; după răcire, se introduc în flacon 1,5µl bromură de etidiu şi se agită până la dispariţia culorii roşii a bromurii.

Se toarnă gelul în suportul pentru gel, se introduce un pieptene şi se lasă să se întărească. (Notă: cuva de electroforeză trebuie să fie aşezată pe un loc perfect plan înaintea turnării gelului). După întărire, se scoate pieptenele prin culisare şi se aşază gelul în cuva de electroforeză care conţine tampon TBE sau TAE 1X.

Pregătirea probelor pentru migrarea în gel necesită un fag, în care se introduc câte 2,5µl loading buffer pentru fiecare probă, plus aceeaşi cantitate pentru markerul molecular de 100pb şi controlul negativ. În continuare, peste buffer se adaugă câte 10µl din fiecare probă (produs PCR). Se omogenizează conţinutul fiecărei celule a fagului, în momentul introducerii probei. După realizarea amestecurilor, se încarcă probele în gelul de agaroză, păstrând ordinea, întotdeauna pe ultima poziţie disponibilă de încărcare fiind situat controlul negativ (C-).

Electroforeza produşilor PCR a fost efectuată în cuve tip FOTODYNE, într-un câmp electric de 90V şi 50 – 60mA, timp de 40 – 50 de minute, în funcţie de mărimea fragmentelor.

4.5. PURIFICAREA PRODUŞILOR PCR ÎN COLOANE QIAGEN

Purificarea tuturor produşilor PCR obţinuţi s-a realizat utilizând un kit de reacţie QIAGEN (QIAquick PCR purification kit) şi un protocol furnizat de aceeaşi firmă. Acestea sunt utilizate pentru purificarea directă a produşilor PCR mono- sau bicatenari cu lungimi cuprinse între 10pb şi 10kb de primerii neataşaţi, nucleotide libere, polimeraze şi săruri. Kit-ul conţine coloane de purificare, tampon PB, tampon PE, tampon EB (producătorul nu furnizează compoziţia fiecărui tampon) şi tuburi colectoare.

Ca primă etapă a purificării, se adaugă 5 volume tampon PB la 1 volum produs PCR şi se amestecă. Nu este necesară îndepărtarea uleiului mineral adăugat în tuburi pentru a împiedica evaporarea în timpul amplificării). Se ataşază coloanele la tuburile colectoare (tuburi cu un volum de 2ml). Produşii PCR amestecaţi cu alcool sunt introduşi în coloane şi se centrifughează la 13000 rotaţii/minut (rpm), timp de 30 – 60 secunde, utilizând o centrifugă de masă. Se descarcă tuburile colectoare, plasând din nou coloanele în aceleaşi tuburi.

Pentru etapa de spălare, se adaugă 0,75ml tampon PE în coloane şi se centrifughează la 13000 rpm timp de 30 – 60s. Se golesc tuburile colectoare şi se centrifughează din nou coloanele timp de 1 minut la 14000 rpm, pentru a elimina

complet alcoolul din probe. Notă: etanolul rezidual nu va fi eliminat complet dacă tubul colector nu este golit înaintea acestei ultime centrifugări.

Se aşază coloanele în tuburi Eppendorf sterile de 1,5ml. Pentru a dizolva ADN din coloane, se adaugă 50µl tampon EB (10mM Tris-Cl, pH=8,5) sau H_2O miliQ în centrul membranei şi se centrifughează coloanele, timp de 1 minut la 13000 rpm. Pentru a creşte concentraţia de ADN, se adaugă numai 30µl tampon EB în centrul membranei, se lasă în repaus 1 minut şi se centrifughează.

4.6. CUANTIFICAREA PRODUŞILOR PCR

4.6.1. PREPARAREA GELULUI DE CUANTIFICARE

Pentru cuantificarea ADN din probele purificate în coloane QIAGEN, se va prepara un gel de agaroză 3%, cu un volum de 30ml. Astfel, pentru un volum de 30ml sunt necesari 3ml TBE 10X care se diluează cu 27ml H_2O bidistilată.

În prepararea gelului sunt utilizate două tipuri de agaroză, cu densităţi diferite; Seakem : Nusieve în raport de 2 : 1, adică 0,6g Seakem : 0,3g Nusieve. Peste acest amestec (0,9g agaroză) se adaugă soluţia TBE 1X, se agită până la omogenizare şi se introduce în cuptorul cu microunde, unde se lasă aproximativ 20 de secunde; se scoate flaconul, se agită pentru o mai bună omogenizare şi se introduce din nou în cuptor pentru alte 20 de secunde. Se răceşte flaconul în jet de apă, se introduc 1,5µl bromură de etidiu şi se agită flaconul până la dispariţia culorii roşii a bromurii de etidiu.

Se toarnă gelul într-o cuvă de gel, se ataşază un pieptene şi se lasă să se răcească. După răcire, se scoate pieptenele şi se introduce gelul în cuva de electroforeză.

4.6.2. PREGĂTIREA PROBELOR PENTRU CUANTIFICARE

Amestecul pentru electroforeză, ca şi în cazul testării produşilor PCR, se realizează într-un fag. În fiecare celulă a fagului (corespunzător numărului de probe plus una pentru marker) se introduc câte 2µl loading buffer. Peste bufferul de încărcare a probelor, se adaugă câte 5µl din fiecare mostră de ADN purificat şi 8µl marker ØX174-*Hinf I*. Se omogenizează conţinutul fiecărei celule a fagului, în momentul introducerii probei. După realizarea amestecurilor, se încarcă probele (amestecul corespunzător fiecărei probe) în gelul de electroforeză.

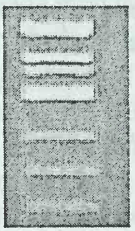
BCU CLUJ / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Migrarea probelor în gel, s-a realizat în cuve de electroforeză tip FOTODYNE, într-un câmp electric de 90V, 50 – 60mA, timp de 40 – 70 minute, în funcţie de mărimea fragmentelor.

4.6.3. CUANTIFICAREA PROBELOR

Markerul molecular este reprezentat de fagul ØX174, cu o lungime de 3500pb. *Hinf I* este o enzimă care taie macromolecula de ADN a fagului, dând fragmente cu lungimi (măsurate în pb) şi greutăţi cunoscute (Tabel 11). Concentraţia fagului în marker este de 0,0375µg/µl fag; dacă se utilizează 8µl marker, atunci vom avea 0,3µg/µl fag.

Tabel 11. Lungimile şi greutăţile fragmentelor de ADN ale fagului ØX174



ØX174-*Hinf I* (pb)	Greutatea fragmentului (ng)
726/713	80
533	29,7
500	28
427/417/413	70
311	17
249	13,9
200	11

Cuantificarea se face prin compararea intensităţii benzilor date de probele purificate cu intensitatea benzilor date de marker. Astfel, pentru fiecare bandă de ADN, se va alege câte o bandă a marker-ului (pe criteriul similarităţii intensităţilor), iar datele vor fi notate într-un tabel sintetic.

Concentraţia ADN (ng/µl) este dată de raportul dintre greutatea (ng) benzii respective şi cantitatea (µl) de ADN purificat încărcată în gel (5µl). Cantitatea de ADN (µl) necesară secvenţierii se aproximează astfel încât să obţinem 60 – 90fmoli ADN dublu catenar, conform Tabelului 12:

De exemplu, pentru a obţine 50fmoli ADN cu o lungime de 500pb, sunt necesare 16ng ADN. Ştiind câte ng sunt necesare pentru a obţine un anumit număr de fmoli, putem aproxima cantitatea de ADN dublu catenar pe care o vom utiliza.

Pentru a obţine cantitatea de fmoli, se înmulţeşte cantitatea de ADN aproximată cu concentraţia ADN (ng/µl) corespunzătoare. În continuare se face echivalenţa cu numărul de fmoli corespunzători la 33ng pentru un segment de 0,5Kpb, date furnizate de Tabelul 12 (Beckman Coulter Protocol).

BCU CLUJ CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Tabel 12. Estimarea concentraţiei ADN

Lungimea (perechi de kilobaze)	ng pentru 25fmoli	ng pentru 50fmoli	ng pentru 100fmoli
0,2	3,3	6,5	13
0,3	4,9	9,8	20
0,4	6,5	13	26
0,5	8,1	16	33
1,0	16	33	65
2,0	33	65	130
3,0	50	100	195
4,0	65	130	260
5,0	80	165	325
6,0	100	195	390
8,0	130	260	520
10,0	165	325	650
12,0	195	390	780

În continuare, va fi calculată cantitatea de H_2O miliQ necesară pentru fiecare probă în reacţia de secvenţiere. Astfel, ştiind că pentru fiecare probă se vor folosi 12,5µl amestec de reacţie şi 7µl de ADN, ştiind cantitatea reală de ADN care va fi folosită, se va scădea această cantitate din 7, obţinându-se cantitatea de apă necesară în reacţie pentru fiecare probă.

4.7. REACŢIA DE SECVENŢIERE

Probele sunt pregătite pentru reacţia de secvenţiere, în tuburi de 0,2ml.

Notă: toţi reactivii kit-ului de secvenţiere trebuie decongelaţi pe gheaţă, iar probele de ADN pentru secvenţiere trebuie de asemenea păstrate permanent pe mediu cu gheaţă.

Ca şi în cazul reacţiei de amplificare genică în PCR, în cazul reacţiei de secvenţiere se foloseşte un kit pe baza căruia se prepară mediul de reacţie (Tabel 13).

Tabel 13. Compoziţia mediului pentru reacţia de secvenţiere

Reactivi	Cantităţi (µl)
10X buffer	2
dNTP mix	1
ddATP	2
ddGTP	2
ddCTP	2
ddTTP	2
Primer (10µM)	0,5
ADN polimerază	1

BCU IAŞI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Cantitatea totală a amestecului de reacţie este de 12,5µl, iar volumul final al reacţiei de secvenţiere este de 20µl; restul de 7,5µl este constituit din ADN sau ADN+H_2O. Odată calculate cantităţile de ADN necesare pentru fiecare probă, astfel încât să obţinem între 60 – 90fmoli, iar dacă această cantitate este mai mică de 7,5µl, se adaugă H_2OmiliQ sterilizată, până când volumul final de ADN plus apă ajunge la 7,5µl.

După adăugarea în toate tuburile a cantităţilor de apă necesare, se prepară amestecul de reacţie, multiplicând fiecare din cantităţile menţionate în Tabelul 14 cu numărul de probe plus 0,5. După prepararea amestecului de reacţie, se repartizează câte 12,5µl în fiecare tub de 0,2ml (tuburile trebuie menţinute pe gheaţă). În continuare, se adaugă cantitatea calculată de ADN şi se omogenizează cu amestecul de reacţie.

4.7.1. REACŢIA DE SECVENŢIERE A GENEI CE CODIFICĂ INFORMAŢIA SINTEZEI CITOCROMULUI B LA CARASSIUS GIBELIO *BLOCH ŞI* CYPRINUS CARPIO *L.*

În cazul tuturor indivizilor aparţinând celor două genuri *Carassius* şi *Cyprinus*, au fost folosiţi aceiaşi primeri L14724 şi H15149 pentru prima parte a genei ca şi în cazul reacţiei de amplificare, cu deosebirea că au fost utilizate concentraţii mai mari (10µM) pentru reacţia de secvenţiere. Programul utilizat a avut o temperatură de aliniere a primerilor de 45,0°C şi un număr de 30 cicluri de replicare (Figura 33).

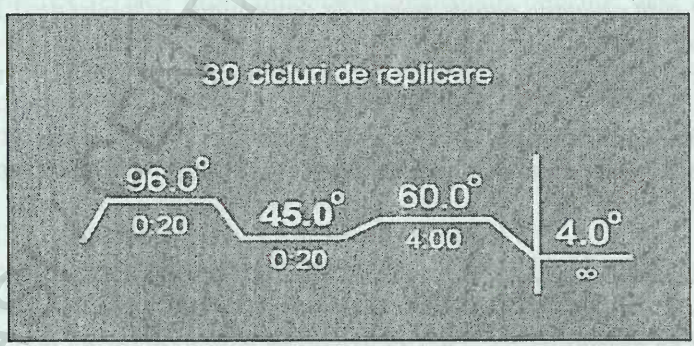


Figura 33. Condiţiile reacţiei de secvenţiere pentru prima parte a citocromului b

Reacţia de secvenţiere pentru al doilea fragment al cytb, ca şi în cazul amplificării, a decurs diferenţiat pentru speciile celor două genuri. În cazul speciilor genului *Cyprinus*, s-au folosit primerii L15138 şi H15910 (Figura 21)

în concentraţie 10μM, urmând un program de secvenţiere cu temperatura de aliniere a primerilor de 47°C (Figura 34).

În cazul speciilor genului *Carassius*, reacţia de secvenţiere a ultimei părţi a genei ce codifică sinteza citocromului b s-a desfăşurat utilizând primerii L15138 pentru catena directă şi Cyt-R pentru catena complementară (Figura 35), în concentraţii de 10μM. Reacţia s-a desfăşurat după un program a cărui temperatură de aliniere a primerilor a fost de 45°C şi 30 cicluri de replicare (Figura 33).

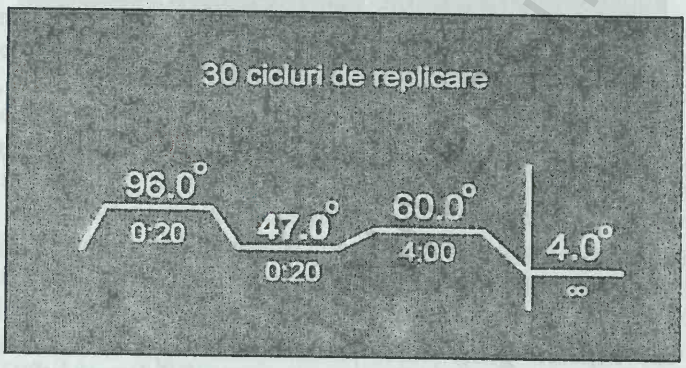


Figura 34. Condiţiile reacţiei de secvenţiere pentru citocromul b ultima parte şi ND4L la speciile genului *Cyprinus*

L15138 5`-ATGATGACCGCCTTCGTAGGCTA-3`
Cyt-R 5`-TCTTTATATGAGAARTANGGGTG-3`

Figura 35. Structura primerilor utilizaţi în reacţia de secvenţiere a părţii a doua a cytb la specii ale genului *Carassius*

4.7.2. REACŢIA DE SECVENŢIERE A REGIUNII DE CONTROL MITOCONDRIAL (D-LOOP), LA CARASSIUS GIBELIO *BLOCH ŞI* CYPRINUS CARPIO *L.*

Pentru reacţia de secvenţiere a d-loop, în cazul speciilor ambelor genuri au fost folosiţi cei doi primeri universali CTRL-A pentru catena directă şi CTRL-E pentru catena antisens (Figura 28), în concentraţii de 10μM. De asemenea, programul utilizat pentru reacţia de secvenţiere a avut o temperatură de aliniere a primerilor de 50°C şi 30 cicluri de replicare (Figura 36).

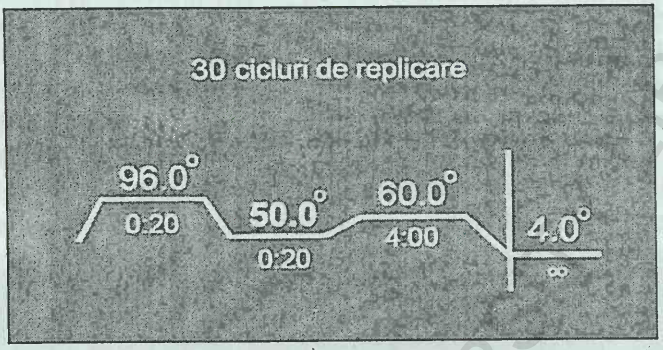


Figura 36. Condiţiile reacţiei de secvenţiere pentru d-loop la specii aparţinând familiei *Cyprinidae* şi ND4L la speciile genului *Carassius*

4.7.3. REACŢIA DE SECVENŢIERE A ND4L LA CYPRINUS CARPIO *L. ŞI* CARASSIUS GIBELIO *BLOCH.*

Pentru secvenţierea genei care codifică informaţia sintezei nicotinamid dehidrogenazei subunitatea 4L, pentru toate speciile analizate, indivizi ginogenetici şi hibrizi, au fost folosiţi aceiaşi primeri L10420 pentru catena sens şi H10720 pentru catena antisens, în concentraţie 10μM. Programele reacţiei de secvenţiere au fost diferite; pentru speciile genului *Cyprinus*, a fost folosită o temperatură de aliniere a primerilor de 47°C în 30 cicluri de replicare (Figura 34).

În cazul speciilor genului *Carassius*, programul de secvenţiere a avut temperatura de aliniere a primerilor de 50°C şi 30 cicluri de replicare (Figura 36).

4.8. PRECIPITAREA ÎN ETANOL A PROBELOR PENTRU SECVENŢIERE (BECKMAN COULTER PROTOCOLS)

Sunt folosit tuburi Eppendorf de 0,5ml care se etichetează cu iniţiala numelui genei şi a catenei.

Se prepară soluţia STOP (1,5M NaOAc şi 0,05M EDTA). Aceste soluţii se prepară în tuburi Eppendorf de 1,5ml în volum de 50μl (sau 100μl pentru precipitarea a 24 de probe). Astfel, se amestecă 25μl de apă miliQ sterilă cu 25μl 3M NaOAc soluţie stoc şi 45μl de apă miliQ sterilă cu 5μl de 0,5M EDTA stoc. Se adaugă în fiecare tub câte 5μl soluţie STOP care conţine 2μl de 1,5M NaOAc, 2μl 0,05M EDTA şi 1μl de glicogen (20mg/ml) care se găseşte în kit-ul de secvenţiere.

Pentru a adăuga această soluție STOP în toate tuburile, se prepară un amestec într-un tub Eppendorf de 1,5ml, astfel (cantitățile sunt date în µl/probă): 1,5M NaOAc 2µl, 0,05M EDTA 2µl şi glicogen 1µl.

Se înmulțesc aceste cantități cu numărul de probe plus 1 şi se adaugă câte 5µl din acest amestec în fiecare tub etichetat anterior. Se centrifughează câteva secunde tuburile de 0,2ml care conțin reacția de secvențiere, se transferă tot conținutul (20µl) în tuburile de 0,5ml unde se află soluția stop şi se omogenizează cu pipeta. Se deschid toate tuburile şi se adaugă câte 65µl etanol 95% rece (–20°C). Se închid tuburile şi se agită bine.

Se centrifughează imediat la 4°C şi 14500rpm, timp de 15 minute.

Notă: cea mai importantă etapă este cea de amestecare a ADN cu soluția stop şi alcoolul, urmată de centrifugarea imediată după amestecare.

După centrifugare, se extrage cu pipeta tot lichidul supernatant. Nu trebuie atins sedimentul, pentru a nu-l desprinde de pereții tubului, şi astfel se poate folosi acelaşi vârf de pipetă (dacă se atinge sedimentul, vârful pipetei trebuie schimbat). Se adaugă câte 190µl etanol 70% în fiecare tub (alcoolul se introduce în tub, prelingându-l pe pereți pentru a nu fragmenta peleta de ADN).

Se centrifughează la 4°C şi 14500rpm, timp de 5 minute (alcoolul trebuie menținut la –20°C). După centrifugare, se elimină cu pipeta tot alcoolul supernatant, urmărind permanent unde se află sedimentul, pentru a nu-l elimina). Se adaugă 190µl etanol 70%, rece, şi se repetă etapa anterioară. După eliminarea alcoolului, se centrifughează (utilizând o centrifugă normală de masă) la 8000rpm, 1 minut. Pentru a sedimenta toate picăturile de alcool care se află pe pereți, cu un vârf de pipetă foarte fin (pentru pipete de 10µl) se elimină tot alcoolul din tuburi. Se lasă tuburile deschise 10 – 15 minute pentru a usca sedimentele, într-o nişă unde nu pătrunde praf. Se scoate formamida din congelator pentru decongelare. După evaporarea completă a alcolului din tuburi, se adaugă în fiecare 40µl formamidă şi se ametecă pe vortex, timp de 5 secunde. Se centrifughează câteva secunde pentru a colecta toate picăturile de pe pereții tuburilor în partea inferioară a acestora. Se lasă la temperatura camerei, 10 minute. Se amestecă din nou pe vortex 5 secunde şi se centrifughează. Se lasă în repaus la temperatura camerei, timp de 10 minute.

Dacă probele vor fi introduse direct în secvențiator, se transferă câte 40µl pe placa pentru probe. În această etapă, se pipetează de câteva ori pentru a resuspenda ADN în formamidă. Dacă probele nu sunt secvențiate imediat, se păstrează tuburile la –20°C. Probele nu pot fi păstrate congelate mai mult de o lună.

Secvențierea propriu-zisă s-a realizat utilizând un secvențiator BECKMAN COULTER CEQ2000 cu opt capilare. Pentru toate genele s-a folosit un timp de secvențiere de 120 minute, exceptând partea a doua a citocromului b, care, datorită lungimii (aproximativ 800pb), a necesitat un timp de 160 minute.

4.9. ANALIZA SECVENȚELOR

Prelucrarea primară a secvențelor sub formă de fluorograme şi corectarea au fost realizate utilizând programul CEQ2000 furnizat de BECKMAN COULTER, iar datele au fost exportate sub formă de text pentru aliniere.

Unirea secvențelor directă şi reversă pentru fiecare individ a fost efectuată utilizând programul ESEE 32 (The Eyeball Sequence Editor), prin aliniere cu secvențele primerilor şi tăierea celor două catene, urmată de unirea într-o catenă unică.

Alinierea tuturor secvențelor unei gene, provenite de la indivizi diferiți (indivizi aparținând la populații diferite, indivizi obținuți prin ginogeneză, precum şi hibrizi), a fost efectuată prin metodele Clustal W. (Thompson *et al.*, 1994) şi Clustal V (Higgins şi Sharp, 1989; Higgins, 1994; Wheeler, 2000) utilizând modulul MegAlign din cadrul programului DNA STAR 5.

Compararea secvențelor, ca şi trasarea arborilor filogenetici, a fost realizată prin utilizarea programului MEGA 2 (Nei şi Kumar, 2000).

4.9.1. MODIFICĂRI EVOLUTIVE ALE SECVENȚELOR DE ADN

Modificările evolutive de la nivelul macromoleculelor de ADN sunt mai complicate decât cele din secvențele proteice, deoarece există mai multe tipuri de ADN, cum ar fi regiunile codificatoare, regiuni necodificatoare, exoni, introni, regiuni terminale, regiuni repetitive şi secvențe de inserție. Modificările produse de mutații la nivelul ADN variază în funcție de zona în care apar. Chiar dacă luăm în considerare o singură regiune codificatoare, modelul substituției nucleotidelor în prima, a doua şi a treia poziție a unui codon este diferit. Mai mult, unele regiuni sunt sub acțiunea selecției naturale mai mult decât altele, acest fapt contribuind la variații ale modelului de evoluție a diferitelor regiuni ale ADN.

4.9.1.1. Diferențe nucleotidice între secvențe

Când două secvențe de ADN provin din aceeaşi secvență ancestrală, evoluează divergent gradual, datorită substituției nucleotidice. Cea mai simplă măsură a divergenței dintre secvențe este proporția siturilor nucleotidice, care diferă între două nucleotide, sau distanța *p* pentru secvențele nucleotidice.

4.9.2. ESTIMAREA NUMĂRULUI DE SUBSTITUȚII NUCLEOTIDICE

În cazul substituției aminoacizilor, distanța p ne dă o estimare a numărului de nucleotide substituite per sit, când secvențele au origine apropiată. Când p are

valoare mare, ne dă o subestimare numerică, deoarece nu ţine cont de mutaţiile înapoi şi de cele paralele.

Pentru a estima numărul substituţiilor nucleotidice, este necesar să folosim un model matematic al substituţiilor nucleotidice. Din acest motiv, a fost constituită o matriţă a ratei substituţiilor nucleotidice (Tabelul 14) (Nei şi Kumar, 2000).

În continuare, vor fi prezentate doar modelele utilizate în prelucrarea datelor din prezenta lucrare, modele alese pe baza numărului de nucleotide implicate, precum şi a numărului de mutaţii apărute în cadrul secvenţei unei gene.

Tabel 14. Modele ale substituţiei nucleotidice (Nei şi Kumar, 2000)

	A	T	C	G	A	T	C	G
Jukes – Cantor model					HKY model			
A	-	α	α	α	-	βg_T	βg_C	αg_G
T	α	-	α	α	βg_A	-	αg_C	βg_G
C	α	α	-	α	βg_A	αg_T	-	βg_G
G	α	α	α	-	αg_A	βg_T	βg_C	-
Kimura model					Tamura – Nei model			
A	-	β	β	α	-	βg_T	βg_C	$\alpha_1 g_G$
T	β	-	α	β	βg_A	-	$\alpha_2 g_C$	βg_G
C	β	α	-	β	βg_A	$\alpha_2 g_T$	-	βg_G
G	α	β	β	-	$\alpha_1 gA$	βg_T	βg_C	-
Equal – input model					General reversible model			
A	-	αg_T	αg_C	αg_G	-	$a g_T$	$b g_C$	$c g_G$
T	αg_A	-	αg_C	αg_G	$a g_A$	-	$d g_C$	$e g_G$
C	αg_A	αg_T	-	αg_G	$b g_A$	$d g_T$	-	$f g_G$
G	αg_A	αg_T	αg_C	-	$c g_A$	$e g_T$	$f g_C$	-
Tamura model					Unrestricted model			
A	-	$\beta\theta_2$	$\beta\theta_1$	$\alpha\theta_1$	-	a_{12}	a_{13}	a_{14}
T	$\beta\theta_2$	-	$\alpha\theta_1$	$\beta\theta_1$	a_{21}	-	a_{23}	a_{24}
C	$\beta\theta_2$	$\alpha\theta_2$	-	$\beta\theta_1$	a_{31}	a_{32}	-	a_{34}
G	$\alpha\theta_2$	$\beta\theta_2$	$\beta\theta_1$	-	a_{41}	a_{42}	a_{43}	-

Notă: un element (e_{ij}) care intră în una din matricele anterioare de substituţie nucleotidică va înlocui nucleotida din rândul *i* cu nucleotida din coloana *j*. g_A, g_T, g_C şi g_G sunt frecvenţele nucleotidelor. $\theta_1 = g_G + g_C$; $\theta_2 = g_A + g_T$.

4.9.2.1. Modelul Jukes – Cantor

Cel mai simplu model de substituţie nucleotidică este cel propus de Jukes şi Cantor în 1969. Acest model presupune că substituţia nucleotidică intervine în orice sit cu frecvenţă egală, astfel încât o nucleotidă este înlocuită cu una din celelalte trei nucleotide rămase cu o probabilitate α pe an (sau o altă unitate de timp). Mai mult, probabilitatea de înlocuire a unei nucleotide cu oricare din celelalte trei este $r=3\alpha$, unde r reprezintă probabilitatea de înlocuire pe sit pe an.

Dacă luăm în considerare două secvenţe *X* şi *Y* care au evoluat divergent dintr-o secvenţă comună ancestrală, cu *t* ani în urmă, şi notăm cu q_t nucleotidele comune dintre cele două secvenţe şi cu p_t ($p_t=1-q_t$) proporţia nucleotidelor diferite, procentul nucleotidelor comune q_{t+1} în timpul *t+1* (măsurat în ani) poate fi obţinut astfel: în primul rând, trebuie să precizăm că acest sit care prezintă nucleotide comune pentru *X* şi *Y* în timpul *t* va rămâne neschimbat în timp, adică în *t+1*, cu o probabilitate $(1-r)^2$ sau aproximativ *1-2r*, deoarece *r* reprezintă o cantitate foarte mică, astfel încât r^2 poate fi neglijat. În plus, un sit care prezintă nucleotide diferite în timpul *t* va avea aceleaşi nucleotide în timpul *t+1* cu o probabilitate *2r/3*. Această probabilitate este obţinută ţinând cont de faptul că în momentul în care secvenţele *X* şi *Z* au nucleotidele *i* respectiv *j*, în timpul *t*, ele devin identice dacă *i* din *X* se schimbă cu *j*, dar *j* din *Y* rămâne neschimbată sau dacă *j* din *Y* este înlocuită cu *i*, iar *i* din *X* rămâne neschimbată. Probabilitatea de apariţie a primului eveniment este de $\alpha(1-r)=r(1-r)/3$, deoarece *i* din *X* trebuie să fie înlocuită cu nucleotida *j* (cu o probabilitate mai mare decât în cazul celorlalte două nucleotide), iar nucleotida *j* din *Y* trebuie să rămână neschimbată. Probabilitatea de apariţie a celui de-al doilea eveniment este de asemenea *r(1-r)/3*. Mai mult, probabilitatea totală este *2r(1-r)/3*, care devine aproximativ *2r/3* dacă nu se ţine cont de valoarea lui r^2.

Dacă:

$$q_{t+1} = (1-2r)q_t + \frac{2}{3}r(1-q_t), \text{ care poate fi scrisă ca:}$$

$$q_{t+1} - q_t = \frac{2r}{3} - \frac{8r}{3}q_t$$

şi dacă notăm diferenţa $q_{t+1} - q_t$ cu dq/dt, atunci vom obţine:

$\frac{dq}{dt} = \frac{2r}{3} - \frac{8r}{3}q$; ţinând cont de condiţia iniţială q=1 la t=0, atunci:

$$q = 1 - \frac{3}{4}\left(1 - e^{-8rt/3}\right).$$

În cazul prezentului model, numărul aşteptat de substituţii nucleotidice pe sit *(d)* pentru două secvenţe este *2rt*. Din acest motiv, valoarea lui *d* este dată de:

$d = -(3/4)\ln[1-(4/3)p]$, unde: $p=1-q$ este procentul nucleotidelor diferite dintre *X* şi *Y* (Jukes şi Cantor, 1969).

O estimare a valorii $(\hat{d})$ poate fi obţinută prin înlocuirea lui *p* cu valoarea observată $(\hat{p})$; în acest caz, varianţa este:

BCU "I. CENTRA UNIVERSITARĂ"

$$V(\hat{d}) = \frac{9p(1-p)}{(3-4p)^2 n}$$ (Kimura şi Ohta, 1972).

În cadrul acestui model, se presupune că rata substituției nucleotidelor este aceeaşi pentru fiecare pereche de nucleotide, astfel încât frecvențele aşteptate ale celor patru baze azotate A, T, C şi G sunt egale cu 0,25. Oricum, nefăcând nici o precizare referitoare la frecvența inițială, valoarea lui d rămâne aceeaşi; altfel spus, nu este necesară o constanță a valorii frecvențelor nucleotidice, pentru ca ecuația ce dă valoarea diferenței (d) să fie aplicabilă (Rzhetsky şi Nei, 1995).

4.9.2.2. Modelul Tamura – Nei

Unul din modelele matematice ce dă concluziile de ordin filogenetic prin metoda maximum likelihood (ML) (metoda probabilității maxime) este cel al lui Hasegawa *et al.* (HKY) (1985). Acest model este un hibrid între modelul bazat pe 2 parametri al lui Kimura şi modelul inputului egal şi ia în considerare atât tranzițiile, cât şi transversiile, precum şi valorile conținutului în GC. Oricum, formulele pentru valoarea lui $(\hat{d})$ în cadrul acestui model sunt destul de complicate (Rzhetsky şi Nei, 1995), astfel încât nu ar trebui să îl luăm în considerare. În plus, acest model este inclus în modelul propus de Tamura şi Nei (1993), ca un caz special, permițând soluții analitice pentru valoarea distanței *(d)*. În acord cu acest model, formula pentru valoarea lui *d* este:

$$d = -\frac{2g_A g_G}{g_R}\ln\left[1-\frac{g_R}{2g_A g_G}P_1-\frac{1}{2g_R}Q\right]-\frac{2g_T g_C}{g_Y}\left[1-\frac{g_Y}{2g_T g_C}P_2-\frac{1}{2g_Y}Q\right]-$$

$$-2\left[g_R g_Y - \frac{g_A g_G g_R}{g_R}-\frac{g_T g_C g_Y}{g_Y}\right]\ln\left[1-\frac{1}{2g_R g_Y}Q\right]$$

unde P_1 şi P_2 sunt proporțiile diferențelor de tranziții dintre A şi G, respectiv dintre T şi C, iar Q este proporția diferențelor datorate transversiilor (Tamura şi Nei, 1993).

4.9.2.3. Distanțe Gamma

În cadrul distanțelor evolutive, rata de substituție a nucleotidelor se presupune a fi aceeaşi pentru toate siturile nucleotidice. În realitate, această presupunere nu este pe deplin valabilă, deoarece rata substituției este diferită în situri diferite. În cazul genelor care codifică proteine, acest fapt este evident, deoarece prima, a doua şi a treia poziție a unui codon prezintă diferite rate de substituție. Existența zonelor pliate în zonele active ale proteinei determină de

BCU / CENTRALA / BIBLIOTECA CENTRALĂ UNIVERSITARĂ

asemenea rate diferite de substituţie de-a lungul siturilor nucleotidice. Variaţia ratei de substituţie poate fi observată şi în genele codificatoare din macromolecula de ARN, deoarece ARNs prezintă forţe de pliere şi adesea formează bucle şi porţiuni bicatenare la baza buclelor, care prezintă diferite rate de substituţie. Analize statistice ale ratei de substituţie *(r)* în diferite situri nucleotidice au sugerat că aceasta variază urmând aproximativ distribuţia gamma dată de ecuaţia:

$$f(r) = \frac{b^a}{\Gamma(a)} e^{-br} r^{a-1},$$

unde $a = \bar{r}^2 / V(r)$ şi $b = \bar{r}^2 / V(r)$, $\bar{r}$ şi $V(r)$ fiind media şi respectiv varianţa ratei de substituţie r (Johnson şi Kotz, 1970). $\Gamma(a)$ este funcţia gamma, definită de formula:

$$\Gamma(a) = \int_0^\infty e^{-t} t^{a-1} dt$$

Forma distribuţiei $f(r)$ este dată de valoarea lui a care este adesea numită conformaţie gamma sau parametru gamma, şi de valoarea lui b care este factor de mărime (Kocher şi Wilson, 1991; Tamura şi Nei, 1993; Wakeley, 1993, 1994).

Din acest motiv, unii autori dezvoltă distanţele gamma corespunzătoare pentru substituţia nucleotidelor. Distanţele gamma pot fi derivate ale aceleiaşi metode matematice, ca şi cele utilizate pentru calcularea distanţelor în cazul secvenţelor de aminoacizi.

4.9.2.4. Varianţa şi covarianţa Bootstrap (a replicărilor repetate)

Există unele metode de estimare a numărului de substituţii ale aminoacizilor între două secvenţe, în funcţie de modelul matematic folosit. În practică, orice model este o aproximare a realităţii şi dă numai valori aproximative ale substituţiei aminoacizilor. Mai mult, formulele analitice pentru calcularea distanţelor varianţelor estimate sunt de asemenea aproximative.

Când trebuie estimate lungimile ramurilor unui arbore filogenetic pentru mai multe secvenţe, aceasta se poate realiza prin metoda LS (least-square = metoda pătratului minim), dar trebuie cunoscute varianţele şi covarianţele distanţelor estimate pentru toate perechile de secvenţe diferite.

BIBLIOTECA CENTRALĂ UNIVERSITARĂ

În aceste cazuri, se poate folosi metoda bootstrap pentru calcularea varianţelor şi covarianţelor distanţelor măsurate. Această metodă nu necesită formularea unei ipoteze referitoare la distribuţiile distanţelor, exceptând faptul că fiecare sit al unui aminoacid poate evolua independent (Efron, 1982a, 1982b; Efron şi Tibshirani, 1993).

Presupunând că avem trei secvenţe proteice cu n aminoacizi, înrudite evolutiv:

$$X_{11}\ X_{12}\ X_{13}\ X_{14}\ X_{15}.....X_{1n}$$
$$X_{21}\ X_{22}\ X_{23}\ X_{24}\ X_{25}.....X_{2n}$$
$$X_{31}\ X_{32}\ X_{33}\ X_{34}\ X_{35}.....X_{3n}$$

X_{ij} reprezintă aminoacidul din poziţia j secvenţa i. Putem astfel calcula valorile d_{ij} pentru secvenţele i şi j. Mai mult, se poate obţine chiar o estimare a distanţei pentru fiecare pereche de secvenţe.

În cadrul acestei metode, pentru calcularea varianţelor şi covarianţelor, o secvenţă aleatoare de trei aminoacizi cu n situri de aminoacizi este generată din setul original de date. Această probă (model) este produsă prin luarea de probe (separarea de modele) din cadrul siturilor aminoacizilor (pe coloane), cu înlocuire, utilizând numere pseudoaleatoare. Acest model aleator al secvenţelor de aminoacizi poate include două sau mai multe reprezentări ale unui sit, dar nici o reprezentare a altuia. De exemplu, un model aleator poate avea următoarele secvenţe cu n situri de aminoacizi.

$$X_{11}\ X_{12}\ X_{12}\ X_{14}\ X_{15}.....X_{1n-1}$$
$$X_{21}\ X_{22}\ X_{22}\ X_{24}\ X_{25}.....X_{2n-1}$$
$$X_{31}\ X_{32}\ X_{32}\ X_{34}\ X_{35}.....X_{3n-1}$$

Acesta poartă numele de *bootstrap resampled data set* şi, odată obţinut, o estimare a distanţelor este calculată cu ajutorul ecuaţiilor:

$$\hat{p} = n_d / n$$
$$d = -\ln(1-p) \quad \text{, pentru oricare trei perechi de secvenţe.}$$
$$\hat{d}_R = \alpha\left[(1-p)^{-1/\alpha} - 1\right]$$

Dacă aceasta se repetă de B ori, poate fi generată distanţa B pentru un număr dat de perechi de secvenţe. Se notează cu $\hat{d}_b$ şi $\hat{d}$ valorile pentru b număr de replicări. În acest caz, varianţa devine:

BCU IAŞI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

$V_B(\hat{d}) = \frac{1}{B-1}\sum_{b=1}^{B}(\hat{d}_b - \bar{d})^2$, unde $\bar{d}$ = media valorilor $\hat{d}_b$ la sfârşitul tuturor replicărilor. Pentru calcularea $V_B(\hat{d})$, de obicei se folosesc 1000 de replicări (B=1000).

O presupunere făcută pentru bootstrap, este aceea că toate siturile evoluează independent. Dacă numărul siturilor examinate este destul de mare (n>100), majoritatea siturilor cu rată evolutivă diferită vor fi reprezentate în fiecare model de bootstrap.

Covarianţa, este dată de:

$$Cov_B(\hat{d}_{ij}, d_{kl}) = \frac{1}{1-B}\sum_{b=1}^{B}(\hat{d}_{ijb} - \bar{d}_{ij})^2(\hat{d}_{klb} - \bar{d}_{kl})^2,$$

unde *ij* şi *kl* se referă la perechile de secvenţe *i* şi *j*, *k* şi *l*.

Un avantaj al acestei metode este acela că poate calcula varianţa şi covarianţa, chiar atunci când nu sunt disponibile formulele matematice şi oferă estimări mai bune decât alte formule analitice (Efron şi Tibshirani, 1993).

4.10. ARBORI FILOGENETICI

Analizele filogenetice ale secvenţelor de ADN sau proteine, au devenit un mijloc important pentru studiul istoriei evolutive a organismelor, de la bacterii la om. De când s-a constatat că rata de evoluţie a ADN variază extensiv cu gena sau segmentul de ADN (Wilson *et al.*, 1977; Dayhoff *et al.*, 1978), se pot studia relaţiile filogenetice existente între toate nivelele de clasificare ale organismelor (regnuri, filumuri, familii, genuri, specii şi populaţii intraspecifice), utilizând diferite gene sau secvenţe de ADN. Analiza filogenetică este de asemenea importantă pentru elucidarea modelelor evolutive ale familiilor de gene (Atchley *et al.*, 1994; Goodwin *et al.*, 1996; Nei *et al.*, 1997), ca şi pentru explicarea proceselor de evoluţie adaptativă, la nivel molecular (Jermann *et al.*, 1995; Chandrasekharan *et al.*, 1996; Zhang *et al.*, 1998).

Reconstrucţia arborilor filogenetici utilizând metode statistice a fost iniţiată independent în cadrul taxonomiei numerice, referitor la caracterele morfologice (Sokal şi Sneath, 1963), şi în genetica populaţională pentru frecvenţa genelor (Cavalli – Sforza şi Edwards, 1964, 1967). Unele metode statistice dezvoltate în

BUCUREŞTI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

aceste scopuri sunt încă utilizate pentru analiza statistică a datelor de ordin molecular, dar, recent, numeroase metode noi au fost dezvoltate.

4.10.1. INFERENŢA FILOGENETICĂ – METODE BAZATE PE DISTANŢĂ

În cadrul metodelor bazate pe distanţă sau pe matrixul de distanţă, acestea sunt calculate pentru toate perechile de taxoni, iar arborii filogenetici sunt construiţi ţinând cont de relaţiile stabilite în jurul valorilor acestor distanţe.

4.10.1.1. UPGMA

Numele metodei provine de la „unweighted pair-group method using arithmetic averages" (UPGMA). Metoda este atribuită autorilor Sokal şi Michener (1958), dar s-a constatat ulterior că prezenta metodă este complet diferită de cea utilizată de aceştia. În schimb, algoritmul apare publicat de către Sneath şi Sokal (1973). Un arbore construit pe baza acestei metode este numit şi fenogramă, deoarece a fost iniţial folosit la reprezentarea gradului de similaritate fenotipică pentru un grup de specii, în cadrul taxonomiei numerice. Oricum, poate fi folosit în filogenia moleculară atunci când rata de substituţie a genelor este mai mult sau mai puţin constantă. În special în cazul în care frecvenţa genelor este folosită în reconstrucţia filogenetică, acest model produce arbori destul de buni, comparativ cu alte metode bazate pe distanţă (Nei *et al.*, 1983; Takezaki şi Nei, 1996). În acest caz, o măsură a distanţei care prezintă un coeficient mai mic de variaţie pare să ducă la construirea de arbori cu o mai mare precizie, comparativ cu alte metode de determinare a distanţei, chiar dacă nu respectă exact numărul de substituţii genice (Takezaki şi Nei, 1996). Prin UPGMA se pot construi arbori pentru evoluţia în cadrul speciilor, cu toate că apar adesea, erori de topologie când rata substituţiei genelor nu este constantă sau când numărul de gene sau nucleotide este mic.

4.10.1.1.1. Algoritmul UPGMA

În cadrul UPGMA, un mod de măsurare a distanţelor evolutive este calcularea acestora pentru toate perechile de taxoni sau secvenţe, valorile distanţelor fiind sub forma unei matrice (Tabelul 15).

B.C.U. „M. EMINESCU" IAŞI
BIOLOGIE

Tabel 15. Prima matrice a distanţelor (Nei şi Kumar, 2000)

Taxon	1	2	3	4
2	d_{12}	-	-	-
3	d_{13}	d_{23}	-	-
4	d_{14}	d_{24}	d_{34}	
5	d_{15}	d_{25}	d_{35}	d_{45}

Din această matrice, rezultă că d_{ij} reprezintă distanţa dintre taxonii *i* şi *j*. Analiza grupată (de tip clustal) a taxonilor începe cu perechea de taxoni între care există cea mai mică distanţă. Presupunând că d_{12} este cea mai mică distanţă dintre toate valorile matricei rezultate, taxonii 1 şi 2 vor fi grupaţi pornind dintr-un ram comun localizat la distanţa $b=d_{12}/2$. Din acestea, putem presupune că lungimea ramurilor celor doi taxoni care provin dintr-un ram comun este aceeaşi. În acest caz, taxonii 1 şi 2 vor fi încadraţi într-un singur taxon compus sau grup $[u=(1\text{-}2)]$, iar distanţa dintre acest grup şi un alt taxon k $(k\neq1,2)$ este dată de: $d_{uk}=(d_{1k}+d_{2k})/2$. În plus, obţinem o nouă matrice (Tabelul 16).

Tabel 16. A doua matrice a distanţelor (Nei şi Kumar, 2000)

Taxon	$u=(1\text{-}2)$	3	4
3	d_{u3}	-	-
4	d_{u4}	d_{34}	-
5	d_{u5}	d_{35}	d_{45}

În continuare, presupunând că distanţa d_{u3} este cea mai mică, taxonii *u* şi 3 vor fi încadraţi într-un nou taxon compus sau cluster $[v=(1\text{-}2\text{-}3)]$, cu o lungime a ramului comun de $b=d_{u3}/2=(d_{13}+d_{23})/(2x2)$. Această distanţă între noul cluster (grup) creat *v* şi fiecare dintre taxonii rămaşi (k) este dată de: $d_{kv}=(d_{k1}+d_{k2}+d_{k3})/3$. Atunci matricea se va transforma în (Tabelul 17):

Tabel 17. A treia matrice a distanţelor

Taxon	$v=(1\text{-}2\text{-}3)$	4
4	d_{v4}	-
5	d_{v5}	d_{45}

Presupunând că d_{v4} este cea mai mică valoare din matricea anterioară, putem încadra $v=(1\text{-}2\text{-}3)$ şi 4 ca având un ram comun dat de $b = d_{v4}/2 =$

$(d_{14}+d_{24}+d_{34})/(3x2)$. Este evident că ultimul taxon care se alătură celorlalţi trei este 5 şi ramul comun este dat de: $b = (d_{15}+d_{25}+d_{35}+d_{45})/(4x2)$.

Este de asemenea posibil ca în cea de-a doua matrice cea mai mică distanţă poate fi d_{45} (sau oricare alta în afară de d_{u3}). În acest caz, taxonii 4 şi 5 sunt uniţi cu ramura comună dată de $b=d_{45}/2$, creându-se astfel un nou taxon compus, $v=(4-5)$. Distanţele între v şi alt taxon (3 şi u) sunt date de $d_{3v}=(d_{34}+d_{35})/2$ şi $d_{uv}=(d_{14}+d_{15}+d_{24}+d_{25})/4$. Presupunând că d_{uv} este cel mai mic, taxonii u şi v sunt grupaţi iar taxonul 3 va fi ultimul care se va alătura grupului. De asemenea, dacă d_{3v} este cel mai mic, taxonii 3 şi v se vor grupa primii.

După cum reiese din exemplul anterior, distanţa dintre două grupuri (A şi B) este dată de următoarea formulă:

$$d_{AB} = \sum_{ij} d_{ij} /(rs),$$

unde r şi s sunt numerele de taxoni în grupele A şi B, iar d_{ij} este distanţa dintre taxonul i din grupul A şi taxonul j din grupul B. Ramura comună dintre cele două grupe este dată de $d_{AB}/2$. Cu toate acestea, în scopul modelării pe calculator, ecuaţia de mai sus nu este utilizabilă, fiind folosiţi algoritmi mai facili pentru a calcula d_{AB} (Swofford *et al.*, 1996).

4.10.1.2. Metoda evoluţiei minime (ME)

În cadrul acestei metode, suma lungimilor tuturor ramurilor estimate este:

$$S = \sum_{i}^{T} \hat{b}_i$$

Ea este calculată pentru toate topologiile posibile, cea corectă fiind topologia cu cea mai mică valoare a lui S. În acest caz, $\hat{b}_i$ este o estimare a lungimii ramului i, iar T este numărul total de ramuri $T=2m-3$.

Ideea metodei minimei evoluţii (minimum evolution ME) a fost prima dată promovată de Edwards şi Cavalli-Sforza (1963), fără a da nici o explicaţie asupra algoritmului. Mai târziu, Kidd şi Sgaramella-Zonta (1971) au sugerat că lungimea totală a ramurilor *[L(S)]* poate fi calculată pe baza valorii absolute ($|\hat{b}_i|$) a tuturor lungimilor estimate ale ramurilor, fără nici o justificare teoretică. Dar, $L(\hat{S})$ nu prezintă proprietăţi statistice care să permită un calcul rapid al valorii lui S, iar testele statistice dezvoltate de Rzhetsky şi Nei (1992, 1993) nu sunt aplicabile pentru *L(S)*. De menţionat este faptul că în prezenţa erorilor

estimate statistic ale ramurilor cu lungime mică, această valoare poate deveni negativă chiar şi pentru o topologie corectă a arborelui (Sitnikova *et al.*, 1995).

ME presupune o examinare a tuturor topologiilor posibile şi găsirea celei cu cea mai mică valoare *S* până la epuizarea tuturor variantelor, iar arborele cu cea mai mică valoare *S* este considerat un arbore filogenetic ME. Baza teoretică a acestei strategii este faptul că arborii filogenetici ME sunt în general identici sau asemănători cu arborii Neighbor-Joining (NJ), când valoarea lui *m* este relativ mică (Saitou şi Imanishi 1989; Rzhetsky şi Nei, 1992), astfel încât arborii de tip NJ pot fi folosiţi ca punct de plecare când valoarea lui *m* este mare.

4.10.1.3. Metoda Neighbor-Joining (NJ)

Deşi metoda ME are proprietăţi statistice utile, necesită o perioadă de calcul suficient de mare atunci când numărul taxonilor comparaţi este mare. Saitou şi Nei (1987) au dezvoltat o metodă eficientă de realizare a arborilor filogenetici, care se bazează pe principiul evoluţiei minime (ME). Această metodă nu examinează toate topologiile posibile, ci, în fiecare stadiu de grupare a taxonilor, se foloseşte un principiu de evoluţie minimă. Această metodă se numeşte Neighbor-Joining (NJ) şi este privită ca o versiune simplificată a metodei ME. Când se folosesc 4 din 5 taxoni, metodele NJ, ME dau rezultate identice (Saitou şi Nei, 1987). Există o oarecare asemănare între NJ şi metoda adiţională de realizare a arborilor, care dă atât topologia, cât şi lungimea ramurii simultan.

Unul dintre conceptele importante în această metodă este reprezentat de „neighbors", definiţi ca doi taxoni conectaţi printr-un singur nod într-un arbore fără punct de origine. De exemplu, taxonii 1 şi 2 din arborele prezentat în figura 11 sunt consideraţi „neighbors" (vecini), pentru că sunt conectaţi doar prin nodul A. Similar, taxonii 5 şi 6 sunt consideraţi „neighbors", dar toate celelalte perechi nu. Cu toate acestea, dacă se combină taxonii 1 şi 2 şi se consideră ca fiind un singur taxon, acesta (1-2) şi taxonul 3 sunt acum „neighbors". Este posibilă definirea topologiei unui arbore prin alăturări succesive ale taxonilor vecini (nj) şi producerea unor noi perechi de taxoni vecini. De exemplu, topologia arborelui din Figura 37 poate fi descrisă prin următoarele perechi de taxoni vecini („neighbors"): (1, 2), (5, 6), (1 – 2, 3) şi (1 – 2 – 3, 4). Astfel, prin găsirea acestor perechi de taxoni vecini, se poate obţine topologia arborelui.

BCU IAŞI

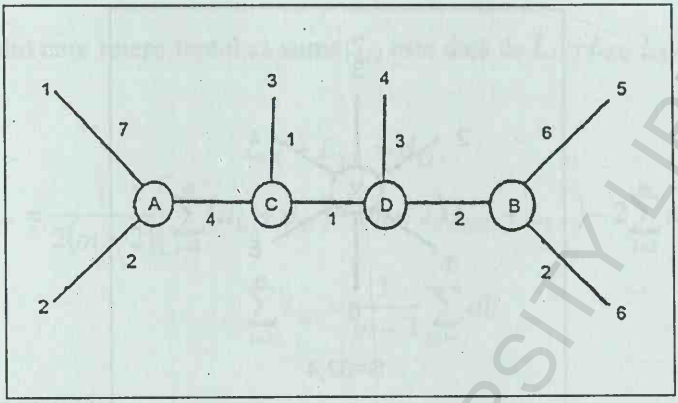


Figura 37. Arborele filogenetic cu lungime ştiută a ramurilor, pentru şase secvenţe (Nei şi Kumar, 2000)

4.10.1.3.1. Algoritmul Neighbor-Joining

Construirea unui arbore prin intermediul acestei metode începe cu arborele în formă de stea, care este produs pe baza presupunerii că nu există o grupare a taxonilor (Figura 38). În practică, această presupunere este în general incorectă. Astfel, dacă se estimează lungimea ramului unui arbore în formă de stea şi se calculează suma tuturor ramurilor *(S_0)*, această sumă ar trebui să fie mai mare decât suma *(S_F)* pentru arborele de tip NJ final. Dacă se elimină taxonii vecini 1 şi 2 din cadrul arborelui prezentat în figura 39, suma *(S_{12})* a tuturor lungimilor ramurilor trebuie să fie mai mică decât S_0, cu toate că este posibil să fie mai mare decât S_F. În practică, deoarece nu se ştie exact care perechi de taxoni sunt vecini, se consideră toate perechile de taxoni ca potenţiale perechi de taxoni vecini şi se calculează suma lungimilor ramurilor *(S_{ij})* pentru taxonii *i* şi *j*; utilizând o topologie similară cu cea din figura 39, se pot alege taxonii *i* şi *j* care au cea mai mică valoare pentru S_{ij} Desigur, valorile distanţelor sunt subiectul erorilor stochastice, astfel încât taxonii vecini aleşi în acest mod nu sunt întotdeauna adevăraţii taxoni vecini. Odată identificată o pereche de taxoni vecini, aceştia sunt încadraţi într-un taxon compus, procedura repetându-se până la producerea arborelui final.

BCU IAŞI "ALEXANDRU IOAN CUZA" UNIVERSITY LIBRARY

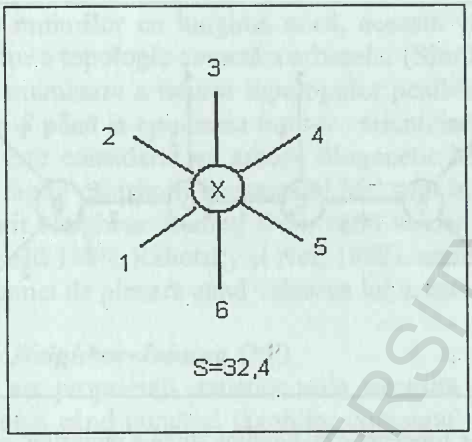


Figura 38. Arbore filogenetic în formă de stea (Nei şi Kumar, 2000)

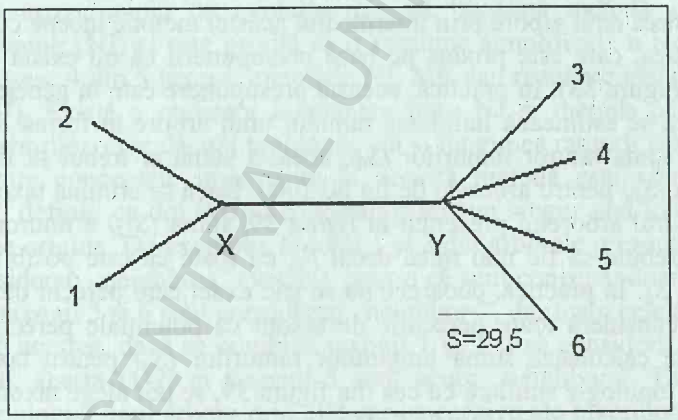


Figura 39. Separarea primilor taxoni vecini (1 şi 2) (Nei şi Kumar, 2000)

Matematic, valoarea sumei S_0 pentru un arbore în formă de stea este:

$S_0 = \sum_{i=1}^{m} L_{iX} = \frac{1}{m-1} \sum_{i<j}^{m} d_{ij} = T/(m-1)$, unde L_{iX} este lungimea braţului estimat între nodurile *i* şi *X*, iar $T=\Sigma_{i<j} d_{ij}$. În acest caz, *i* reprezintă un anumit nod exterior, iar *X* nodul interior (Figura 38). În situaţia opusă, aşa cum este în cazul

BCU IAŞI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

figurii 39, din care reiese faptul că suma S_{12} este dată de L_{1X}+L_{2X}, L_{XY} şi $\sum_{i=3}^{m} L_{iZ}$.

Dar,

$$L_{1X} + L_{2X} = d_{12},$$

$$L_{XY} = \frac{1}{2(m-2)}\left[\sum_{i=3}^{m}(d_{1i} + d_{2i}) - (m-2)(L_{1X} + L_{2X}) - 2\sum_{i=3}^{m} d_{iY}\right]$$

$$\sum_{i=3}^{m} L_{iY} = \frac{1}{m-3}\sum_{3\le i<j} dij$$

De unde rezultă:

$$S_{12} = L_{1X} + L_{2X} + L_{XY} + \sum_{i=3}^{m} L_{iY} = \frac{1}{2(m-2)}\sum_{i=3}^{m}(d_{1i} + d_{2i}) + \frac{1}{m-2}\sum_{3\le i<j} d_{ij}$$

Dacă notăm $R_1 = \sum_{i=3}^{m} d_{1i}$ şi $R_2 = \sum_{i=3}^{m} d_{2i}$, atunci S_{12} poate fi exprimată:

$$S_{12} = \frac{2T - R_1 - R_2}{2(m-2)} + \frac{d_{12}}{2}$$

Desigur, S_{ij} poate fi calculată în acelaşi mod dacă înlocuim *1* şi *2* cu *i* şi *j* în ecuaţia de mai sus. Ultima ecuaţie necesită mult mai puţin timp de calcul decât cea anterioară. Mai mult, dacă *T* este acelaşi pentru toate perechile de tipul *i* şi *j*, S_{ij} poate fi înlocuit cu:

$$Q_{ij} = (m-2)d_{ij} - R_i - R_j$$

în scopul de a calcula valoarea relativă a lui S_{ij}.

Odată cu determinarea celei mai mici valori a lui S_{ij}, poate fi creat un nou nod (A), care permite conectarea taxonilor *i* şi *j*. Lungimile braţelor (b_{Ai} şi b_{Aj}) din acest nod până la taxonii *i* şi *j* sunt date de:

$$b_{Ai}\ \frac{1}{2(m-2)}\left[(m-2)d_{ij} + R_i - R_j\right]$$

(Saitou şi Nei, 1987)

$$b_{Aj}\ \frac{1}{2(m-2)}\left[(m-2)d_{ij} + R_i - R_j\right]$$

BCU IAŞI CENTRALA UNIVERSITARĂ LIBRARY

Aceste valori sunt determinate prin metoda pătratului minim, pentru actuala topologie a arborelui. Următorul pas, este calcularea distanței dintre noul nod A şi taxonii rămaşi (k; 3≤k≤m) (Figura 40).

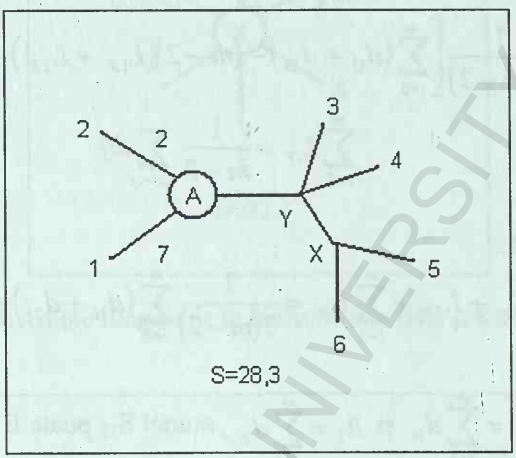


Figura 40. Separarea nodului A de restul taxonilor (Nei şi Kumar, 2000)

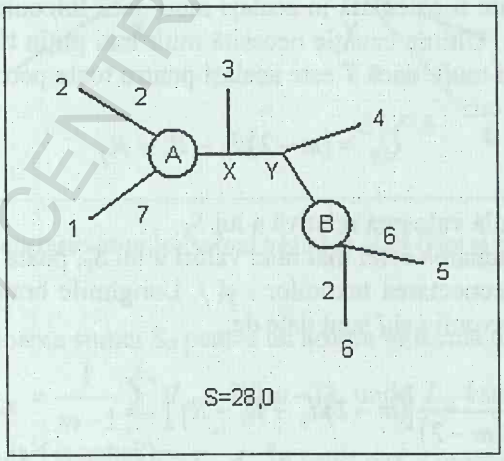


Figura 41. Separarea taxonilor 5 şi 6 prin formarea nodului B (Nei şi Kumar, 2000)

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

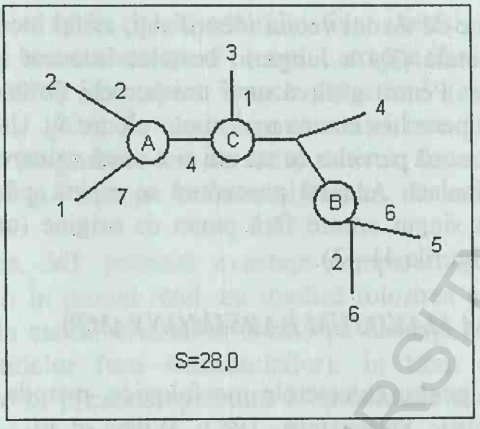


Figura 42. Separarea taxonului 3 prin apariţia nodului C
(Nei şi Kumar, 2000)

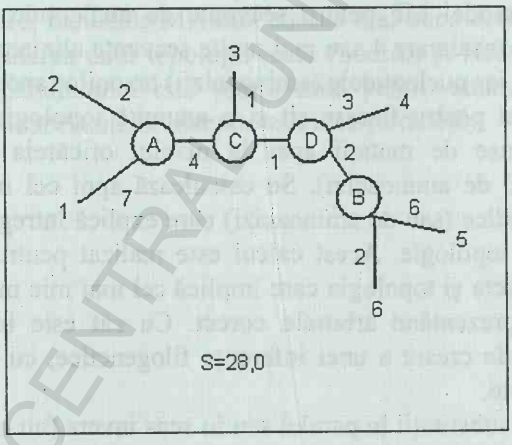


Figura 43. Separarea taxonului 4 prin apariţia nodului D
(Nei şi Kumar, 2000)

Această distanţă este dată de:

$$d_{Ak} = \left(d_{ik} + d_{jk} - d_{ij}\right)/2$$

Dacă se calculează toate distanţele pe baza acestei valori, vom obţine o nouă matrice de tipul *(m-1)(m-1)*. Pentru această nouă matrice, putem calcula o nouă sumă S_{ij}, care va fi notată cu S_{ij}`, deoarece nu include lungimea ramurilor externe

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

pentru prima pereche de taxoni vecini identificaţi, astfel încât apare ca fiind mai mică decât suma totală *(S_{ij})* a lungimii braţelor la acest nivel al construcţiei arborelui filogenetic. Pentru găsirea unei noi perechi de taxoni vecini, se ia în considerare din nou perechea cu cea mai mică valoare S_{ij}. Un nou nod B poate fi creat pentru această nouă pereche de taxoni şi o nouă valoare a matricei distanţei *(m-2)(m-2)* este calculată. Această procedură se repetă, până când toţi taxonii sunt grupaţi într-un singur arbore fără punct de origine (unrooted tree) de tip neighbor-joining (Figurile 41-43).

4.10.2. METODA MAXIMUM PARSIMONY (MP)

Elaborată iniţial pentru caracterele morfologice, metoda prezintă mai multe versiuni (Wiley, 1981; Felsenstein, 1982; Wiley *et al.*, 1991; Maddison şi Maddison, 1992; Swofford şi Begle 1993). Eck şi Dayhoff (în 1996) par a fi fost primii care au utilizat această metodă pentru realizarea arborilor, pornind de la secvenţe de aminoacizi. Fitch (1971) şi Hartigan (1973) au elaborat un algoritm mai riguros al metodei MP pentru secvenţe de nucleotide. În cadrul acestei metode se iau în considerare 4 sau mai multe secvenţe aliniate de nucleotide sau aminoacizi *($m \geq 4$)*, iar nucleotidele (aminoacizii) taxonilor ancestrali sunt luate în considerare separat pentru fiecare sit şi o anumită topologie, presupunând că modificările produse de mutaţii apar la nivelul oricăreia dintre cele patru nucleotide (sau 20 de aminoacizi). Se calculează apoi cel mai mic număr de substituţii nucleotidice (sau de aminoacizi) care explică întregul proces evolutiv pentru o anumită topologie. Acest calcul este realizat pentru toate topologiile presupuse a fi corecte şi topologia care implică cel mai mic număr de substituţii este aleasă ca reprezentând arborele corect. Cu cât este implicat mai puţin procesul evolutiv de creare a unei inferenţe filogenetice, cu atât putem obţine concluzii mai exacte.

Dacă nu există substituţii în paralel sau în sens invers (nu există omologie) la fiecare sit nucleotidic şi numărul de nucleotide examinate *(n)* este foarte mare, ar trebui ca utilizând MP să se obţină arborele real. Cu toate acestea, în practică, secvenţele de nucleotide suferă adesea substituţii în paralel sau în sens invers, şi *n* este relativ mic. În acest caz, MP tinde să confere o topologie incorectă. În plus, Felsenstein (1981) a arătat că atunci când rata substituţiei nucleotidelor variază proporţional cu direcţia evolutivă, MP poate genera topologii incorecte chiar şi atunci când se examinează un număr foarte mare de nucleotide. În anumite condiţii, aceasta se poate întâmpla chiar şi atunci când rata de substituţie este constantă pentru toate direcţiile evolutive (Hendy şi Penny, 1989; Takezaki şi Nei, 1996). În acest caz, ramurile lungi (sau cele scurte) ale arborelui real tind

să se alăture sau se atrag în cadrul arborelui final. Astfel, acest fenomen este adesea numit „long branch attraction" (*engl.* „atracţia dintre ramurile lungi") (Hendy şi Penny, 1989) sau „short branch attraction" (*engl.* „atracţia dintre braţele scurte") (Nei, 1996). În analiza parsimoniei este de asemenea dificilă abordarea inferenţei filogenetice într-un cadru statistic, deoarece nu există o cale de calcul al mediei şi varianţei numărului minim de substituţii obţinute pe criteriul parsimoniei.

Cu toate acestea, MP prezintă avantaje comparativ cu alte metode de realizare a arborilor. În primul rând, nu implică folosirea unui număr mare de supoziţii necesare în cadrul metodelor bazate pe distanţă sau pe probabilitatea substituţiei nucleotidelor (sau aminoacizilor). În timp ce toate modelele matematice utilizate în prezent reprezintă o aproximare a realităţii, MP poate furniza arbori adecvaţi comparativ cu alte metode atunci când gradul de divergenţă al secvenţelor este scăzut. De fapt, simulările au arătat că atunci când: 1. gradul de divergenţă al secvenţelor este scăzut *($d \leq 0,1$)*; 2. rata substituţiei nucleotidelor este mai mult sau mai puţin constantă; 3. numărul de nucleotide examinate este mare, metodele MP sunt adesea mai bune decât metodele bazate pe distanţă, în obţinerea unor topologii reale (Sourdis şi Nei, 1988; Nei, 1991). În plus, analiza parsimoniei este foarte utilă pentru anumite tipuri de date moleculare, de tipul secvenţelor inserate sau inserţii/deleţii.

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

CAPITOLUL 5

REZULTATE ŞI DISCUŢII

Principalele direcţii urmărite în cadrul temei şi care vor constitui obiectul prezentului capitol sunt: determinarea omogenităţii loturilor, dozarea cantităţii de ADN şi stabilirea intervalelor de variabilitate, amplificarea genelor şi secvenţierea acestora.

Referitor la determinarea omogenităţii loturilor, s-a considerat necesară această etapă, în principal pentru a exclude o variabilă dată de diferenţele morfologice şi condiţiile de creştere, care ar fi putut determina erori în stabilirea intervalelor de variabilitate ale cantităţii de ADN total.

5.1. STABILIREA OMOGENITĂŢII LOTURILOR

Pe baza parametrilor fenotipici înregistraţi conform figurii 11 şi a indicilor fenotipici calculaţi, utilizând metodele prezentate în capitolul 4.1 au fost obţinute valorile pentru loturile analizate, diferenţiat pentru cele două genuri *Cyprinus* şi *Carassius*. Astfel, în cazul speciilor genului *Cyprinus*, din datele prezentate în tabelul 18 şi figura 44, se poate observa că valorile medii ale erorilor standard sunt destul de scăzute, iar limitele intervalelor de variabilitate (calculate cu o probabilitate de α=0,05 şi *n-1* grade de libertate, adică, la o valoare a lui *t* de 2,021) ale parametrilor fenotipici investigaţi sunt foarte restrânse, ceea ce ne sugerează o omogenitate a loturilor investigate. În plus, în cazul indicilor analizaţi se constată, de asemenea, valori foarte mici ale erorii standard (între 0,009 pentru indicele de circumferinţă şi 0,027 pentru indicele de profil) şi ale coeficientului de variaţie (0,38 pentru indicele de profil), fapt care ne confirmă încă o dată uniformitatea fenotipică a indivizilor analizaţi, cu toate că provin din regiuni geografice diferite (Iaşi şi Larga-Jijia – Movileni) şi au origini diferite (indivizi ginogenetici hibrizi, hibrizi şi indivizi normali).

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Tabel 18. Parametrii fenotipici calculaţi, la indivizii genului *Cyprinus*

Populaţia		Nr.crt.	Lt (cm)	Ls (cm)	Lc (cm)	Ha (cm)	Hd (cm)	G (g)	C (cm)	Ip	Ic K	CF
Larga-Jijia – Movileni	Indivizi cu solzi	1	27,6	24,6	7,3	3,9	9,7	442	20,5	2,55	1,20	2,96
		2	27,0	23,8	7,1	3,7	11,7	413	18,2	2,03	1,31	3,07
		3	27,7	24,9	7,4	3,9	11,5	400	18,8	2,17	1,32	2,60
		4	28,2	24,9	7,5	4,1	10,4	487	19,6	2,40	1,27	3,17
		5	27,4	23,7	7,2	3,9	11,1	408	19,4	2,14	1,23	3,05
	Indivizi fără solzi	6	25,8	22,5	6,8	3,4	10,9	430	19,5	2,06	1,15	3,80
		7	28,3	25,3	7,6	4,1	10,9	452	19,1	2,32	1,32	2,79
		8	27,9	24,8	7,4	4,0	10,9	487	20,1	2,27	1,23	3,20
		9	28,6	25,7	7,8	4,2	10,3	463	19,5	2,49	1,31	2,74
		10	27,8	24,6	7,1	4,1	9,5	451	20,6	2,59	1,19	3,03
		11	25,3	21,7	6,3	3,2	10,9	358	19,1	1,99	1,14	3,51
		12	29,1	25,9	7,6	4,2	11,5	506	20,6	2,25	1,26	2,90
		13	26,9	22,8	6,7	3,4	11,9	351	18,4	1,92	1,24	2,96
		14	29,3	25,6	7,2	4,2	9,8	345	20,5	2,62	1,25	2,06
		15	26,0	21,4	6,0	3,2	11,2	502	18,3	1,91	1,17	5,15
	Indivizi ginogenetici ↕ Crap-oglindă	16	28,1	24,7	7,2	3,9	10,0	369	19,0	2,46	1,30	2,44
		17	26,2	21,9	6,2	3,4	9,6	372	20,3	2,29	1,08	3,53
		18	29,2	25,7	7,6	4,1	10,9	500	20,6	2,35	1,24	2,96
		19	27,9	22,1	6,4	3,9	10,3	485	19,3	2,14	1,14	4,51
		20	25,6	24,7	7,2	3,2	11,2	475	19,8	2,20	1,25	3,15
		21	25,4	22,9	6,7	3,4	9,8	402	18,5	2,34	1,24	3,36
		22	29,2	25,5	7,1	4,2	10,5	427	20,4	2,44	1,25	2,57
		23	26,9	22,6	6,6	3,6	10,2	436	18,6	2,21	1,22	3,78
		24	26,2	22,3	6,2	3,4	11,1	341	18,5	2,02	1,20	3,06
		25	26,2	22,4	6,3	3,4	10,6	358	18,8	2,11	1,19	3,18
Iaşi		26	28,1	24,8	7,2	3,8	11,0	343	18,8	2,25	1,32	2,25
		27	28,1	24,1	6,1	4,0	11,3	403	19,5	2,12	1,23	2,89
		28	29,1	25,9	7,4	4,3	11,3	437	20,5	2,30	1,26	2,52
		29	27,5	23,7	6,6	3,6	11,3	389	19,3	2,10	1,23	2,93
		30	26,9	22,8	6,2	3,4	10,2	454	18,9	2,25	1,21	3,83
		31	28,0	24,3	7,6	4,1	9,8	507	20,1	2,49	1,21	3,53
		32	27,2	24,0	7,6	3,8	10,6	360	20,0	2,26	1,20	2,60
		33	25,3	21,8	6,1	3,2	9,3	347	20,5	2,34	1,07	3,35
		34	26,9	22,7	6,4	3,5	9,8	475	19,5	2,32	1,16	4,06

BCU IAŞI CENTRUL DE CARTE LIBRARY

Populaţia	Nr.crt.	Lt (cm)	Ls (cm)	Lc (cm)	Ha (cm)	Hd (cm)	G (g)	C (cm)	Ip	Ic K	CF
	35	28,5	24,1	7,2	4,0	11,0	406	18,3	2,19	1,31	2,92
	36	25,7	22,3	6,1	3,5	10,4	450	18,5	2,15	1,21	4,06
	37	27,4	24,6	7,3	4,0	11,3	464	19,7	2,18	1,25	3,11
	38	27,2	24,0	7,1	4,0	9,4	398	18,2	2,55	1,32	2,88
	39	28,4	23,5	6,8	4,1	9,3	410	19,9	2,51	1,18	3,16
	40	26,4	23,0	6,6	3,7	11,5	410	18,7	2,01	1,23	3,37
	41	25,4	21,9	6,1	3,5	9,6	368	19,6	2,27	1,11	3,52
	42	26,7	24,0	7,4	3,9	11,4	501	18,8	2,11	1,28	3,64
	43	29,3	25,8	7,7	4,2	10,5	341	20,3	2,47	1,27	1,99
	44	28,3	24,9	7,5	3,9	9,7	451	20,2	2,57	1,23	2,92
	45	29,9	25,6	7,3	4,6	11,1	463	20,3	2,31	1,26	2,76
	46	28,5	24,4	7,0	3,8	11,4	398	20,1	2,14	1,22	2,73
	47	26,0	22,6	6,8	3,4	11,6	404	19,3	1,95	1,17	3,48
	48	26,7	22,3	6,7	3,6	10,9	469	19,0	2,06	1,17	4,21
	49	25,4	22,2	6,7	3,3	11,3	497	18,7	1,96	1,19	4,52
	50	28,1	24,7	7,3	3,9	9,7	344	20,0	2,53	1,23	2,28
Media		27,3	23,8	6,95	3,78	10,6	423	19,4	2,25	1,22	3,18
Deviaţia standard		1,25	1,34	0,53	0,35	0,73	52,7	0,76	0,19	0,06	0,64
Coeficient de variaţie		2,50	2,67	1,05	0,69	1,46	105,	1,52	0,38	0,12	1,27
Eroarea standard		0,17	0,18	0,07	0,04	0,10	7,46	0,1	0,02	0,01	0,09
Limita superioară a intervalului de confidenţă		27,7	24,1	7,30	4,14	10,9	423,	19,8	2,61	1,58	3,53
Limita inferioară a intervalului de confidenţă		27	23,4	6,59	3,42	10,2	422	19	1,89	0,86	2,82

Ip=indice profil; **Ic K**=indice de circumferinţă Kieslev; **CF**=coeficient Fulton; **Lt**=lungimea totală, **Ls**=lungime standard, **Lc**=lungimea capului, **Ha**=înălţimea la nivelul înotătoarei anale, **Hd**=înălţimea la nivelul înotătoarei dorsale, **G**=greutate, **C**=circumferinţă

BCU IASI / BIBLIOTECA CENTRALA UNIVERSITARA

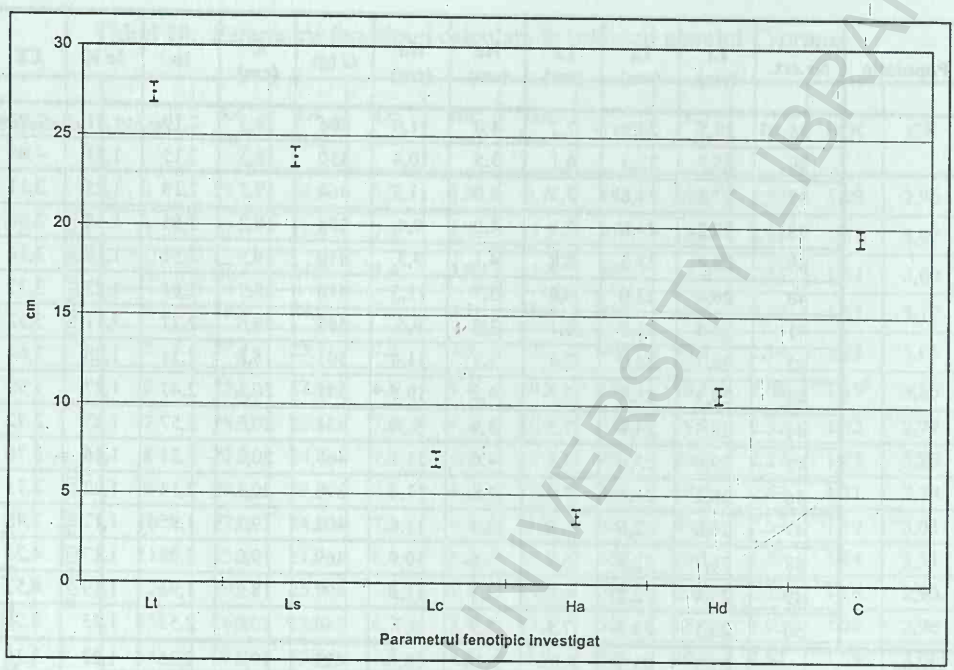


Figura 44. Intervalele de variabilitate ale parametrilor fenotipici investigaţi la speciile genului *Cyprinus*

Analizând datele observate în cazul speciilor genului *Carassius* (Tabelul 19), putem constata că valorile erorii standard sunt foarte mici, ceea ce semnifică o grupare a tuturor datelor foarte aproape de valoarea medie pe probă şi parametru investigat. Pe baza erorii standard a mediei şi a valorii lui *t* dată de $\alpha=0,05$ (adică, o probabilitate de 95%) şi *n-1* grade de libertate (unde *n* reprezintă numărul de valori din fiecare probă), s-au calculat limitele intervalelor de variabilitate pentru toţi parametrii şi indicii fenotipici investigaţi. Din reprezentarea grafică a intervalelor de variabilitate (Figura 45), se observă limitele reduse ale tuturor parametrilor, ceea ce semnifică o uniformitate a indivizilor analizaţi. De asemenea, analizând indicele de profil, se constată că acesta variază între limite foarte înguste la cei 50 de indivizi (2,19 – 3,19cm). Chiar şi pentru coeficientul Fulton, valorile sunt destul de restrânse, fiind cuprinse între 4,77 şi 9,19g/cm. Toate aceste valori ne confirmă încă o dată că loturile analizate sunt uniforme din punct de vedere morfologic.

BCU ALEXANDRU IOAN CUZA UNIVERSITY LIBRARY

Tabel 19. Parametrii fenotipici calculați la indivizii genului *Carassius*

Populația	Nr. crt.	Lt (cm)	Ls (cm)	Lc (cm)	Ha (cm)	Hd (cm)	G (g)	C (cm)	Ip	IK	CF
Larga-Jijia - Movileni	1	18,2	15,8	4,0	2,0	5,9	257	15,3	2,68	1,03	6,52
	2	19,5	15,6	3,7	2,4	6,3	274	15,2	2,48	1,03	7,22
	3	19,2	15,9	4,1	2,2	6,1	252	14,7	2,61	1,08	6,27
	4	21,7	17,8	4,4	2,6	6,9	371	17,6	2,58	1,01	6,58
	5	18,5	14,7	4,1	1,9	5,2	248	15,2	2,83	0,97	7,81
	6	19,2	15,6	4,1	2,3	5,5	262	14,6	2,84	1,07	6,90
	7	19,9	16,6	4,2	2,3	6,2	268	15,8	2,68	1,05	5,86
	8	17,3	14,4	3,6	1,4	5,0	243	14,4	2,88	1,00	8,14
	9	18,3	14,6	3,8	2,0	5,9	260	15,6	2,47	0,94	8,35
	10	21,0	17,2	4,4	2,4	6,7	342	16,8	2,57	1,02	6,72
	11	20,7	17,2	4,3	2,3	6,5	309	16,3	2,65	1,06	6,07
	12	18,6	15,5	4,3	2,1	5,9	249	15,7	2,63	0,99	6,69
	13	20,6	16,7	4,3	2,3	6,6	284	16,3	2,53	1,02	6,10
	14	20,0	16,4	4,8	2,0	5,8	289	15,6	2,83	1,05	6,55
	15	20,2	16,7	4,4	2,1	6,3	277	16,1	2,65	1,04	5,95
	16	20,1	16,6	4,1	2,4	6,6	280	16,6	2,52	1,00	6,12
	17	18,6	15,3	3,9	2,0	5,7	261	14,8	2,68	1,03	7,29
	18	21,3	17,3	4,9	2,4	6,7	340	17,0	2,58	1,02	6,57
	19	18,4	15,4	4,0	1,8	5,4	264	14,0	2,85	1,10	7,23
	20	18,4	15,2	3,6	2,1	5,9	263	14,3	2,58	1,06	7,49
	21	18,1	15,0	3,9	2,0	6,1	266	14,8	2,46	1,01	7,88
	22	18,7	15,3	3,9	2,0	5,7	266	14,8	2,68	1,03	7,43
	23	17,7	14,4	3,6	1,9	5,4	243	13,2	2,67	1,09	8,14
	24	18,0	14,8	4,1	1,9	5,5	237	14,2	2,69	1,04	7,31
	25	19,2	15,7	4,1	2,1	6,0	250	16,1	2,62	0,98	6,46
Iași	26	19,4	16,2	4,1	2,1	6,2	255	15,3	2,61	1,06	6,00
	27	18,8	15,4	4,1	2,0	5,9	264	14,8	2,61	1,04	7,23
	28	17,1	13,9	3,7	2,0	5,6	231	14,3	2,48	0,97	8,60
	29	18,9	15,9	3,6	2,0	5,8	250	15,2	2,74	1,05	6,22
	30	17,3	14,2	3,9	2,1	5,6	243	14,3	2,54	0,99	8,49
	31	18,0	14,8	3,9	1,9	5,9	247	14,6	2,51	1,01	7,62
	32	17,4	15,4	4,3	1,4	5,4	269	15,1	2,84	1,02	7,43
	33	20,0	15,1	4,1	2,6	5,6	283	14,3	2,70	1,06	8,24

BCU IAȘI - DIGITAL LIBRARY

Populația	Nr. crt.	Lt (cm)	Ls (cm)	Lc (cm)	Ha (cm)	Hd (cm)	G (g)	C (cm)	Ip	IK	CF
	34	17,9	14,9	4,5	2,0	5,5	243	15,7	2,70	0,95	7,38
	35	19,5	14,5	3,7	2,3	5,5	253	16,6	2,62	0,87	8,31
	36	18,1	16,9	4,1	2,4	6,6	257	16,6	2,56	1,02	5,37
	37	17,3	16,3	4,2	1,4	6,7	244	16,8	2,43	0,97	5,68
	38	20,7	16,2	3,8	2,0	5,8	273	14,0	2,82	1,16	6,36
	39	18,6	16,8	3,8	1,4	6,4	253	15,2	2,61	1,11	5,31
	40	19,6	17,0	4,4	2,6	5,3	268	16,5	3,19	1,03	5,40
	41	19,6	16,6	4,2	1,4	5,8	331	14,4	2,86	1,15	7,29
	42	18,7	16,4	3,9	2,6	6,1	289	14,7	2,68	1,12	6,52
	43	18,6	17,1	3,7	2,4	6,6	240	14,1	2,58	1,21	4,77
	44	17,6	16,7	4,8	1,9	5,9	237	14,1	2,82	1,19	5,09
	45	19,4	16,0	4,6	1,4	5,5	302	14,5	2,90	1,11	7,37
	46	18,3	16,3	4,6	1,5	6,2	243	14,6	2,63	1,12	5,57
	47	21,1	14,6	4,5	1,6	6,7	287	14,0	2,19	1,04	9,19
	48	20,5	16,8	4,5	2,4	5,8	244	14,8	2,90	1,13	5,14
	49	19,6	17,3	4,4	1,5	5,8	278	15,0	3,00	1,15	5,39
	50	17,7	14,3	3,8	1,9	6,0	240	15,6	2,37	0,92	8,21
Media		19,02	15,83	4,12	2,04	5,96	267,59	15,20	2,66	1,04	6,84
Deviația standard		1,17	0,99	0,34	0,34	0,46	29,47	0,97	0,17	0,07	1,07
Coeficient de variație		2,34	1,99	0,67	0,67	0,91	58,93	1,93	0,34	0,13	2,13
Eroarea standard		0,16	0,14	0,04	0,04	0,06	4,16	0,13	0,02	0,01	0,15
Limita superioară a intervalului de confidență		19,38	16,18	4,47	2,39	6,32	267,94	15,56	3,02	1,40	7,19
Limita inferioară a intervalului de confidență		18,66	15,46	3,75	1,68	5,60	267,22	14,84	2,30	0,68	6,47

Ip=indice profil; **Ic K**=indice de circumferință Kieslev; **CF**=coeficient Fulton; **Lt**=lungimea totală, **Ls**=lungime standard, **Lc**=lungimea capului, **Ha**=înălțimea la nivelul înotătoarei anale, **Hd**=înălțimea la nivelul înotătoarei dorsale, **G**=greutate, **C**=circumferință

BCU IAȘI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

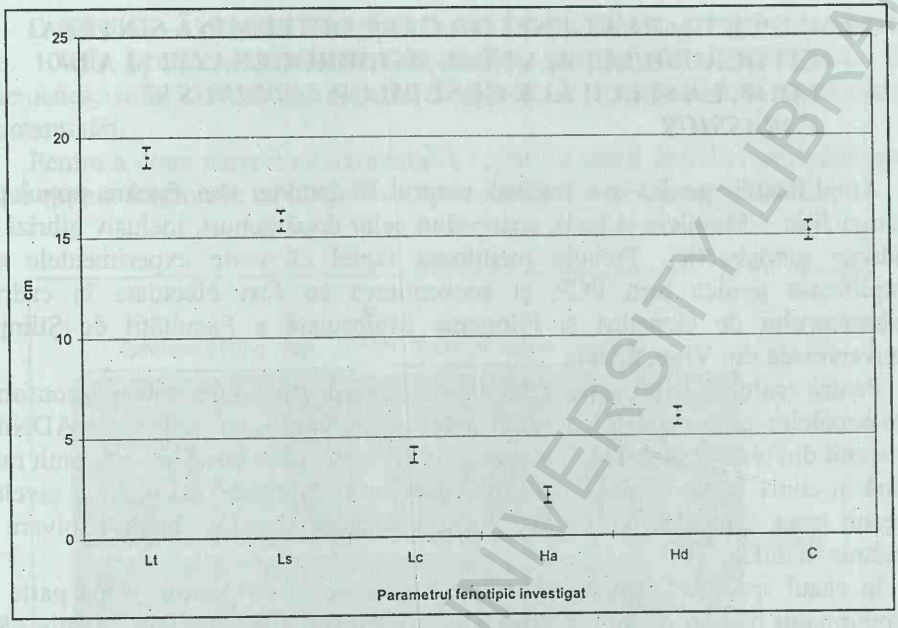


Figura 45. Intervalele de variabilitate ale parametrilor fenotipici analizaţi, la speciile genului *Carassius*

Comparând valorile medii ale celor doi indici şi a coeficientului Fulton, pentru ambele genuri investigate (Tabel 20), putem constata că valorile sunt aproximativ egale, ceea ce denotă că există similaritate fenotipică chiar şi între indivizii celor două genuri. Astfel, se constată că există o diferenţă foarte mică (0,41) în ceea ce priveşte indicele de profil pentru indivizii celor două genuri, de unde rezultă că, morfologic, populaţiile studiate sunt asemănătoare.

Tabel 20. Compararea indicilor calculaţi pentru cele două genuri

Nr. crt.	Indici fenotipici	*Cyprinus*	*Carassius*
1	Indice de profil	2,25	2,66
2	Indice de circumferinţă	1,22	1,04
3	Coeficient Fulton	3,18	6,84

BCU IAŞI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

5.2. AMPLIFICAREA GENELOR CARE DETERMINĂ SINTEZA CITOCROMULUI B, A ND4L DEHIDROGENAZEI ŞI A D-LOOP, LA SPECII ALE GENURILOR *CYPRINUS* ŞI *CARASSIUS*

Amplificarea genică s-a realizat pentru 10 indivizi din fiecare populaţie (Larga-Jijia – Movileni şi Iaşi), aparţinând celor două genuri, inclusiv hibrizi şi indivizi ginogenetici. Trebuie menţionat faptul că toate experimentele de amplificare genică prin PCR şi secvenţierea au fost efectuate în cadrul Laboratorului de Genetică şi Filogenie Moleculară a Facultăţii de Ştiinţe, Universitatea din Vigo, Spania.

Pentru toate cele trei gene, reacţiile de amplificare s-au desfăşurat conform protocoalelor prezentate în capitolul anterior, pe baza unei matriţe de ADNmt provenit din ţesutul muscular, deoarece s-a constatat că purificarea este mult mai bună în ciuda faptului că ADNmt este prezent în cantitate mai mică la nivelul acestui ţesut, fapt care, pe de altă parte, determină şi o mai bună dizolvare a acestuia în buffer TE.

În cazul speciilor genului *Cyprinus*, s-a constatat că pentru prima parte a citocromului b, s-au obţinut în urma amplificării fragmente de aproximativ 480 perechi de baze (pb) (Figura 46).

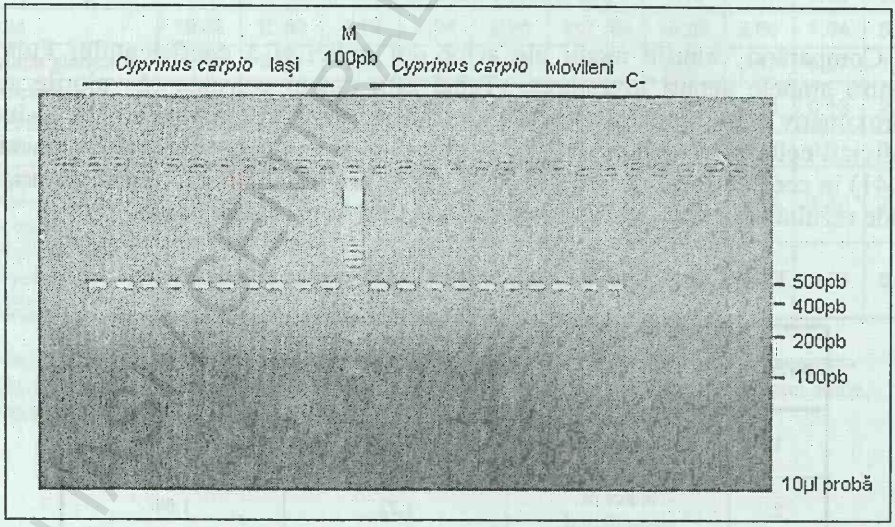


Figura 46. Electroforeză în gel de agaroză 1,5%, pentru prima parte a cytb la indivizi ai genului *Cyprinus* **(C– = control negativ, M = marker molecular de 100pb)**

BCU CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

După cum s-a precizat în capitolul anterior, s-a folosit un marker molecular de 100pb pentru determinarea lungimilor fragmentelor amplificate. De asemenea, rolul controlului negativ (C–) este de determinare a eventualelor contaminări.

Pentru a doua parte a citocromului b (cytb) în cazul speciilor aceluiaşi gen, s-au obţinut fragmente cu lungimi de aproximativ 800pb (Figura 47).

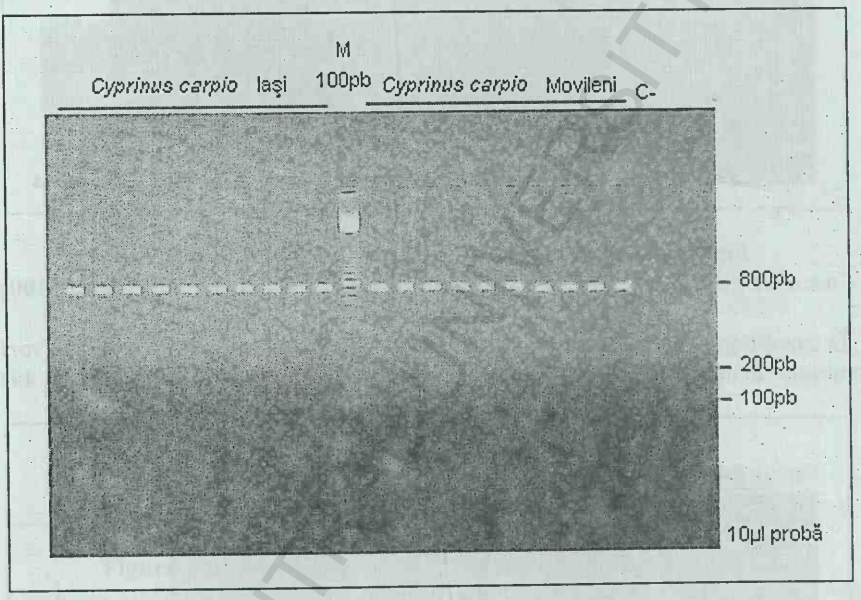


Figura 47. Electroforeză în gel de agaroză 1,5%, pentru a doua parte a Cytb la indivizi ai genului *Cyprinus* **(C– = control negativ, M = marker molecular de 100pb)**

În cazul speciilor genului *Carassius gibelio* Bloch, după cum a fost precizat şi în capitolul anterior (4.3.4.1.), amplificarea citocromului b a avut loc într-o singură etapă, obţinându-se un segment de aproximativ 1200pb (Figura 48).

Potrivit datelor furnizate de banca de gene (GenBank din cadrul NCBI – National Center for Biotechnology Information), lungimea totală a citocromului b la ambele genuri studiate este de aproximativ 1140pb. Rezultatele obţinute de noi în urma clonării acestei gene, după cum reiese din figurile anterioare, nu corespund acestor date, deoarece segmentele amplificate includ secvenţele primerilor şi fragmente din secvenţele genelor limitrofe, deoarece primerii utilizaţi se aliniază în majoritatea cazurilor în aceste zone.

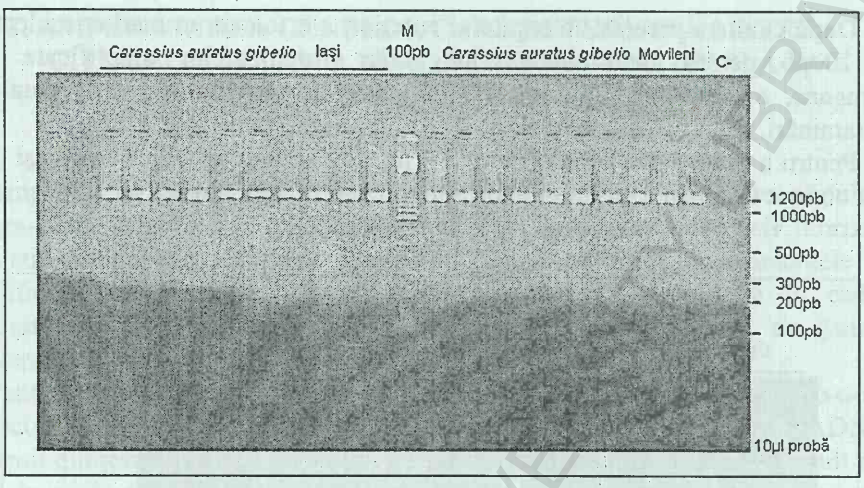


Figura 48. Electroforeză în gel de agaroză 1,5%, pentru Cytb
la *Carassius gibelio* Bloch **(C– = control negativ, M = marker molecular de 100pb)**

În cazul regiunii de control mitocondrial (d-loop), pentru indivizii genului *Cyprinus,* s-au obținut în urma clonării fragmente cu lungimi de aproximativ 420pb (Figura 49).

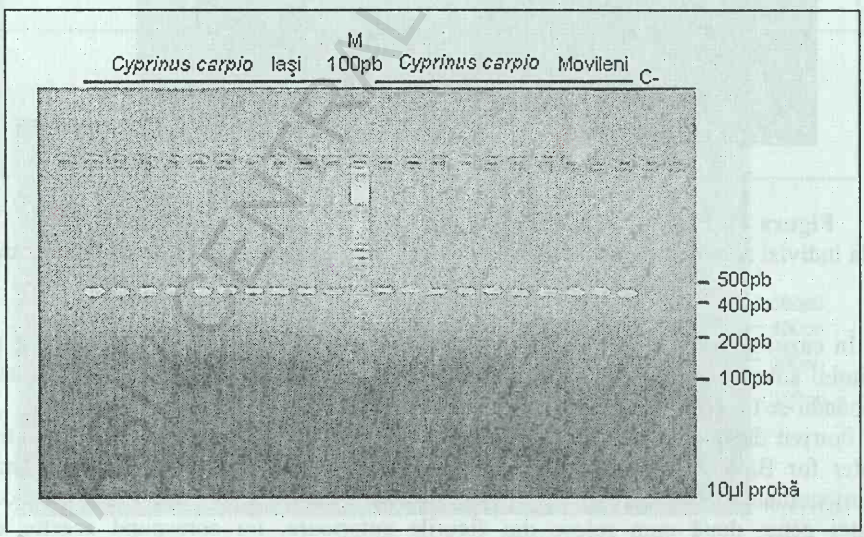


Figura 49. Electroforeză în gel de agaroză 1,5%, pentru d-loop
la indivizi ai genului *Cyprinus* **(C– = control negativ, M = marker molecular de 100pb)**

La *Carassius gibelio*, pentru toți indivizii analizați, în urma amplificării d-loop s-au obținut fragmente cu lungimi de aproximativ 300pb (Figura 50), datorită poziției primerilor utilizați, care determină amplificarea doar a primului segment hipervariabil al acestei gene.

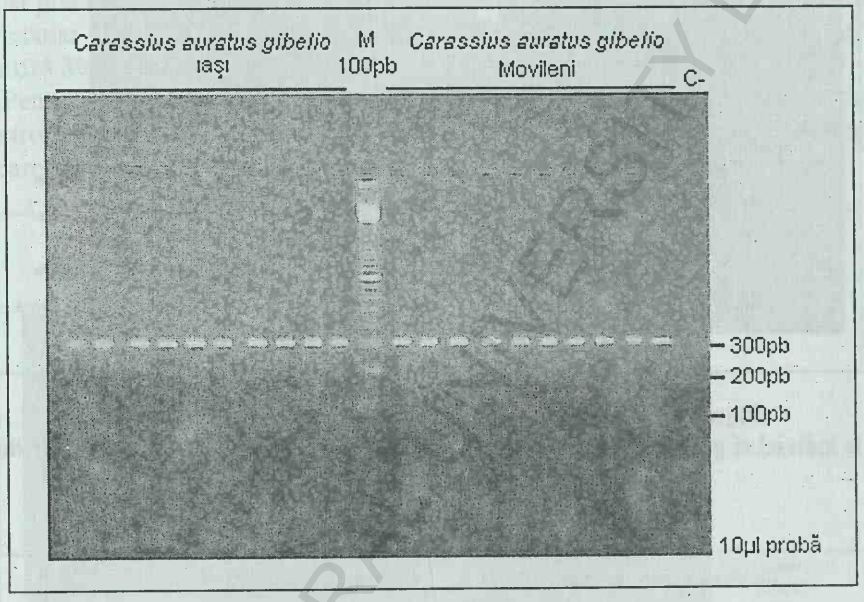


Figura 50. Electroforeză în gel de agaroză 1,5%, pentru d-loop la *Carassius gibelio* Bloch **(C– = control negativ, M = marker molecular de 100pb)**

Amplificarea subunității 4L a dehidrogenazei a determinat obținerea unui segment de aproximativ 280pb pentru indivizii ambelor genuri *Cyprinus* (Figura 51) și *Carassius* (Figura 52).

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

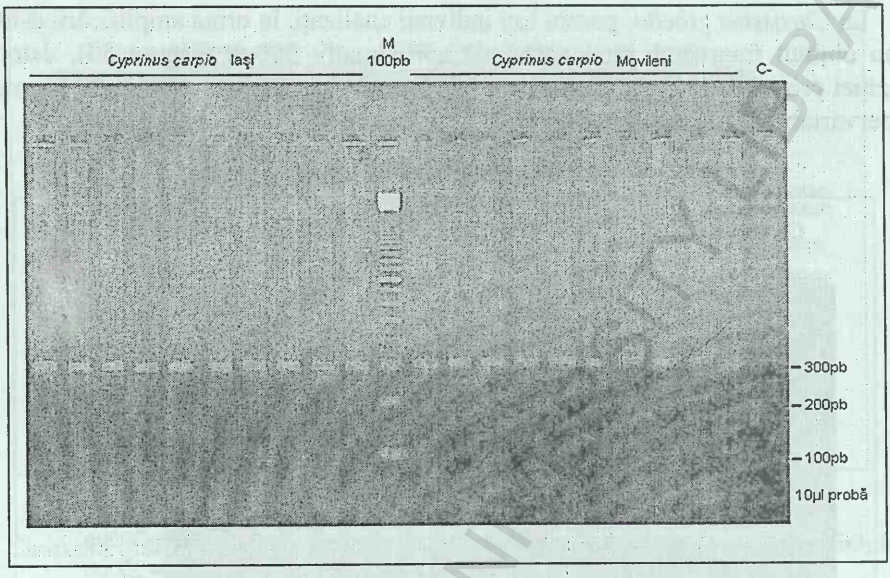


Figura 51. Electroforeză în gel de agaroză 1,5%, pentru ND4L la indivizi ai genului *Cyprinus* **(C– = control negativ, M = marker molecular de 100pb)**

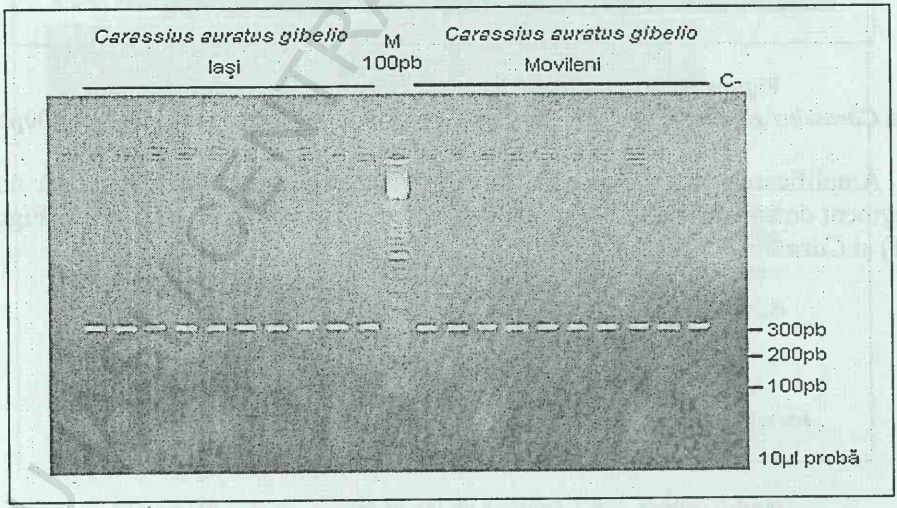


Figura 52. Electroforeză în gel de agaroză 1,5%, pentru ND4L la *Carassius gibelio* Bloch **(C– = control negativ, M = marker molecular de 100pb)**

BCU CENTRALA

5.3. CUANTIFICAREA AMPLIFICĂRII GENELOR CLONATE, ÎN VEDEREA SECVENŢIERII

Cuantificarea produşilor PCR reprezintă estimarea cantităţilor de produs purificat şi determinarea cantităţilor necesare reacţiei de secvenţiere. După cum a fost precizat şi în capitolul 4.6.2, cuantificarea se realizează utilizând markerul molecular ØX174-*Hinf I* prin migrarea produşilor PCR purificaţi, într-un gel de agaroză 3%.

Pentru prima parte a citocromului b, la speciile genului *Cyprinus*, pe baza electroforegramei (Figura 53) au fost estimate cantităţile de ADN existente în fiecare probă (Tabelul 21).

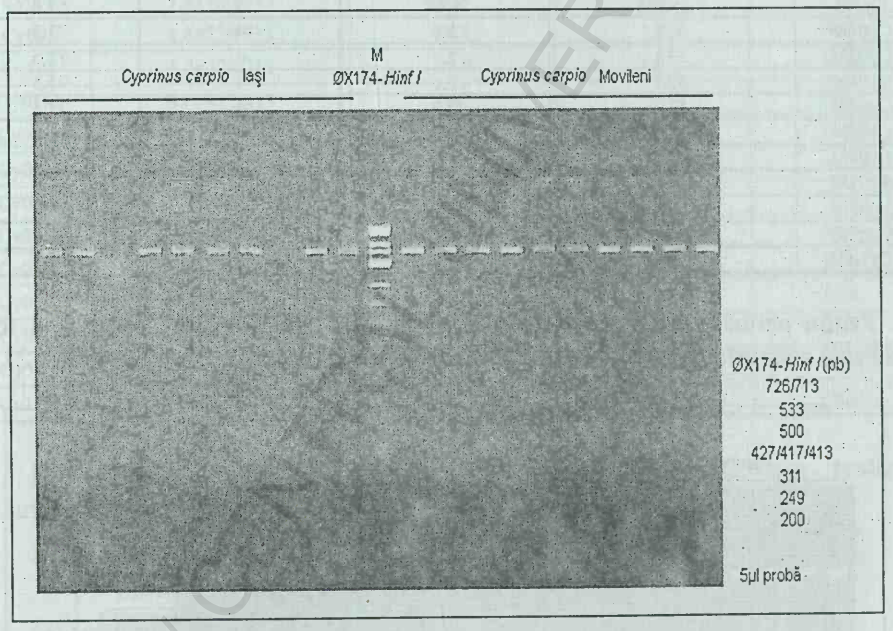


Figura 53. Electroforeză în gel de agaroză 3%, pentru cytb prima parte la indivizi ai genului *Cyprinus*

Din tabelul 21, putem constata că valorile concentraţiilor de ADN amplificat în PCR şi purificat, corespunzătoare primei părţi a citocromului b, sunt suficient de ridicate, astfel încât să se obţină concentraţii suficiente (între 60 şi 90 fmoli) pentru reacţia de secvenţiere.

Tabel 21. Estimarea cantităților de ADN necesare secvențierii primei părți a cytb, pentru indivizi ai genului *Cyprinus*

Nr. probă	Banda	Concentrația ADN (ng/ul)	Cantitatea de ADN (µl)	fmol
Cy01I	533	5,9	4	71,5
Cy02I	500	5,6	4,5	76,3
Cy03I	1/2x200	1,1	7,6	25
Cy04I	500	5,6	4	67,8
Cy05I	0,8x500	4,48	5	67,5
Cy06I	533	5,9	4	71,5
Cy07I	500	5,6	4	67,8
Cy08I	533	5,6	4	71,5
Cy09I	533	5,9	4	71,5
Cy10I	0,8x500	4,48	5	67,8
Cy01M	533	5,6	4	71,5
Cy02M	533	5,9	4	71,5
Cy03M	533	5,6	4	71,5
Cy04M	533	5,9	4	71,5
Cy05M	0,8x500	4,48	5	67,8
Cy06M	0,8x500	4,48	5	67,8
Cy07M	500	5,6	4	67,8
Cy08M	500	5,6	4	67,8
Cy09M	500	5,6	4	67,8
Cy10M	500	5,6	4	67,8

Pentru partea a doua a citocromului b la specii ale genului *Cyprinus*, a fost realizată cuantificarea pe baza figurii 54, iar datele au fost sintetizate în tabelul 22.

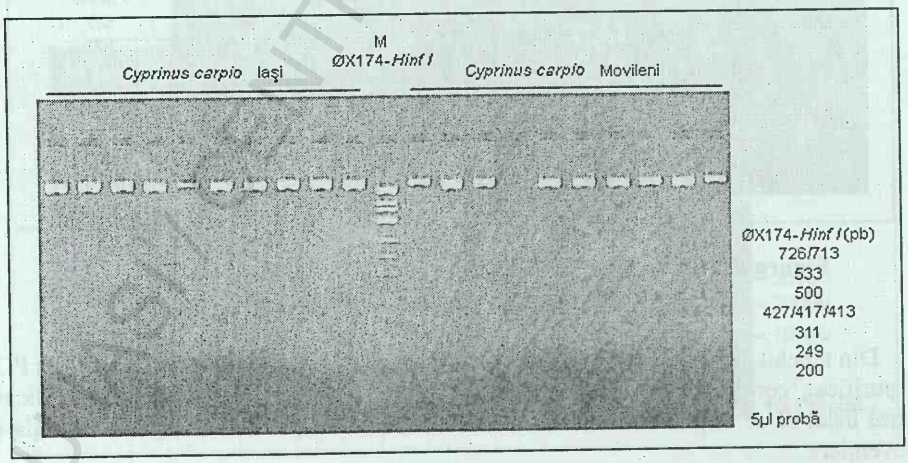


Figura 54. Electroforeză în gel de agaroză 3%, pentru cytb partea a doua, la indivizi ai genului *Cyprinus*

BCU CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Tabel 22. Estimarea cantităților de ADN necesare secvențierii cytb a doua parte, pentru indivizi ai genului *Cyprinus*

Nr. probă	Banda	Concentrația ADN (ng/ul)	Cantitatea de ADN (µl)	fmol
Cy01I	533	5,94	6	67,5
Cy02I	1,8x726/713	28,8	1,5	81,8
Cy03I	1,8x726/713	28,8	1,5	81,8
Cy04I	1,5x726/713	24	1,5	68,18
Cy05I	1,8x726/713	28,8	1,5	81,8
Cy06I	1,8x726/713	28,8	1,5	81,8
Cy07I	2x726/713	32,0	1	60,6
Cy08I	1,8x726/713	28,8	1,5	81,8
Cy09I	1,8x726/713	28,8	1,5	81,8
Cy10I	1,3x726/713	28,8	1,5	81,8
Cy01M	427/417/413	14	3	79,54
Cy02M	1,8x726/713	28,8	1,5	81,8
Cy03M	1,8x726/713	28,8	1,5	81,8
Cy04M	0,5x200	1,1	7,5	15,6
Cy05M	1,8x726/713	28,8	1,5	81,8
Cy06M	1,8x726/713	28,8	1,5	81,8
Cy07M	1,8x726/713	28,8	1,5	81,8
Cy08M	1,8x726/713	28,8	1,5	81,8
Cy09M	1,8x726/713	28,8	1,5	81,8
Cy10M	427/417/413	14	3	79,54

La indivizii genului *Carassius* din ambele populații, s-a realizat cuantificarea întregului citocrom b (Figura 55 și Tabelul 23).

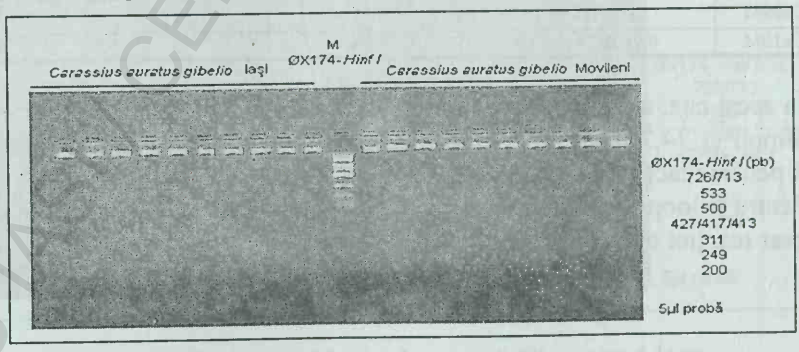


Figura 55. Electroforeză în gel de agaroză 3%, pentru cytb, la indivizi ai genului *Carassius*

BCU IAȘI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Se observă că, doar în cazul unui singur individ (Cy04M) nu s-a obținut cantitatea de ADN dorită pentru reacția de secvențiere, cu toate că este posibil ca aceasta să decurgă normal.

Tabel 23. Estimarea cantităților de ADN necesare secvențierii cytb pentru indivizi ai genului *Carassius*

Nr. probă	Banda	Concentrația ADN (ng/ul)	Cantitatea de ADN (µl)	fmol
Ca01I	427/417/413	14	2	70,7
Ca02I	0,7x427/417/413	9,8	3	74,2
Ca03I	0,7x427/417/413	9,8	3	74,2
Ca04I	427/417/413	14	2	70,7
Ca05I	427/417/413	14	2	70,7
Ca06I	726/713	16	1,55	60,6
Ca07I	726/713	16	1,55	60,6
Ca08I	427/417/413	14	2	70,7
Ca09I	427/417/413	14	2	70,7
Ca10I	427/417/413	14	2	70,7
Ca01M	427/417/413	14	2	70,7
Ca02M	726/713	16	1,55	60,6
Ca03M	427/417/413	14	2	70,7
Ca04M	427/417/413	14	2	70,7
Ca05M	427/417/413	14	2	70,7
Ca06M	427/417/413	14	2	70,7
Ca07M	427/417/413	14	2	70,7
Ca08M	427/417/413	14	2	70,7
Ca09M	427/417/413	14	2	70,7
Ca10M	0,7x427/417/413	9,8	3	74,2

În acest caz, au fost obținute valori ale concentrației de ADN, cuprinse între 60,6fmoli şi 74,2fmoli ADN, ceea ce asigură un optim al cantității de produs PCR pentru reacția de secvențiere.

Pentru d-loop la speciile genului *Cyprinus,* s-au calculat cantitățile de ADN necesar reacției de secvențiere, pe baza figurii 56.

BCU IAŞI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

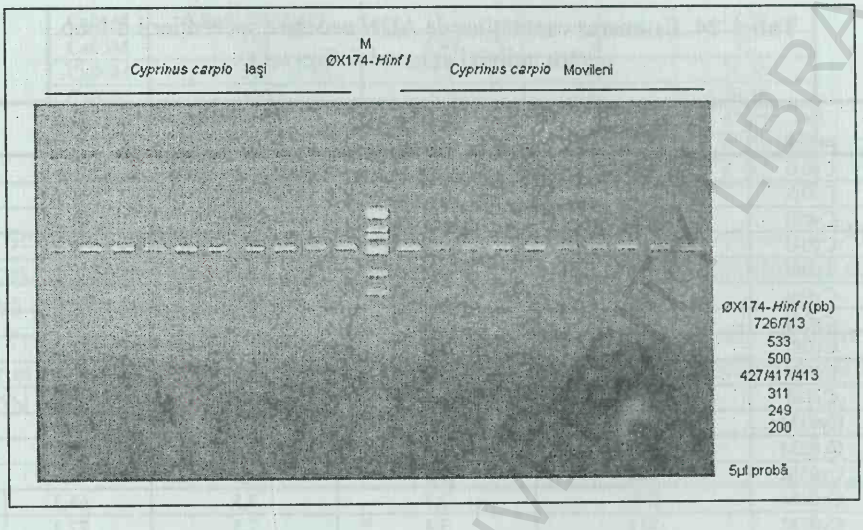


Figura 56. Electroforeză în gel de agaroză 3%, pentru d-loop, la indivizi ai genului *Cyprinus*

Comparativ, la indivizii genului *Carassius* s-au obţinut cantităţi mai mari de produs PCR purificat şi, implicit, cantităţi mai mari de ADN ce pot fi utilizate pentru reacţia de secvenţiere (Figura 57 şi Tabelul 24).

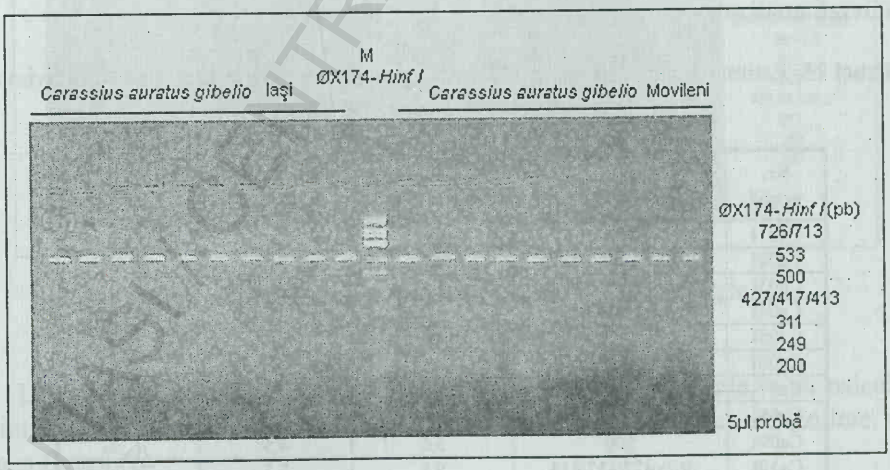


Figura 57. Electroforeză în gel de agaroză 3%, pentru d-loop, la indivizi ai genului *Carassius*

Tabel 24. Estimarea cantităților de ADN necesare secvențierii d-loop pentru indivizi ai genului *Cyprinus*

Nr. probă	Banda	Concentrația ADN (ng/ul)	Cantitatea de ADN (µl)	fmol
Cy01I	200	2,2	7,5	50
Cy02I	311	3,4	7,5	77,2
Cy03I	249	2,7	7,5	61,3
Cy04I	500	5,6	4,5	76,3
Cy05I	200	2,2	7,5	50
Cy06I	200	2,2	7,5	50
Cy07I	200	2,2	7,5	50
Cy08I	249	2,7	7,5	61,3
Cy09I	311	3,4	7,5	77,2
Cy10I	200	2,2	7,5	50
Cy01M	200	2,2	7,5	50
Cy02M	200	2,2	7,5	50
Cy03M	200	2,2	7,5	50
Cy04M	249	2,7	7,5	61,3
Cy05M	311	3,4	7,5	77,2
Cy06M	200	2,2	7,5	50
Cy07M	200	2,2	7,5	50
Cy08M	249	2,7	7,5	61,3
Cy09M	200	2,2	7,5	50
Cy10M	200	2,2	7,5	50

Din tabelul 24 se observă că s-au obținut cantități de ADN cu valori cuprinse între 50fmoli pentru majoritatea indivizilor şi 77,2 fmoli pentru trei dintre indivizii analizați.

Tabel 25. Estimarea cantităților de ADN necesare secvențierii d-loop pentru indivizi ai genului *Carassius*

Nr. probă	Banda	Concentrația ADN (ng/ul)	Cantitatea de ADN (µl)	fmol
Ca01I	533	5,94	4	72
Ca02I	0,7x427/417/413	9,8	2,5	74,24
Ca03I	0,8x427/417/413	11,2	2	67,87
Ca04I	0,8x427/417/413	11,2	2	67,87
Ca05I	533	5,94	4	72
Ca06I	533	5,94	4	72
Ca07I	0,8x427/417/413	11,2	2	67,87
Ca08I	0,5x427/417/413	7	3,5	74,24
Ca09I	500	5,6	4,5	76,36
Ca10I	0,7x427/417/413	9,8	2,5	74,24
Ca01M	533	5,94	4	72
Ca02M	500	5,6	4,5	76,36
Ca03M	0,8x427/417/413	11,2	2	67,87

BCU CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Ca04M	0,8x427/417/413	11,2	2	67,87
Ca05M	533	5,94	4	72
Ca06M	500	5,6	4,5	76,36
Ca07M	500	5,6	4,5	76,36
Ca08M	0,8x427/417/413	11,2	2	67,87
Ca09M	0,8x427/417/413	11,2	2	67,87
Ca10M	0,8x427/417/413	11,2	2	67,87

Se poate observa din tabelul 25 că s-au obţinut cantităţile optime de ADN necesare reacţiei de secvenţiere pentru toţi indivizii analizaţi, aparţinând celor două populaţii Iaşi şi Larga-Jijia – Movileni.

Pentru subunitatea 4L a dedidrogenazei (ND4L) în cazul speciilor şi varietăţilor analizate pentru genul *Cyprinus*, s-au calculat cantităţile necesare de ADN pe baza figurii 58.

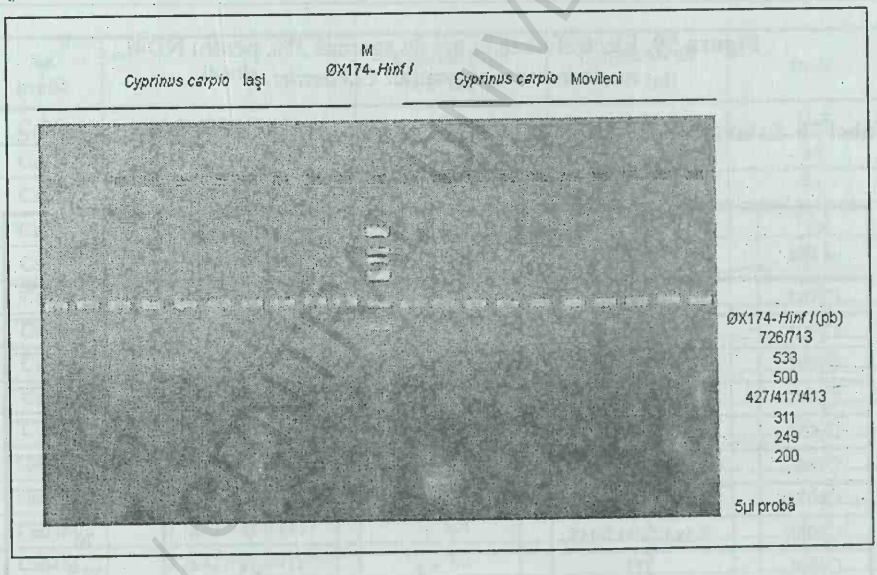


Figura 58. Electroforeză în gel de agaroză 3%, pentru ND4L, la indivizi ai genului *Cyprinus*

La indivizii genului *Carassius* din ambele populaţii analizate, s-au calculat cantităţile de ADN (produs PCR purificat) necesare reacţiei de secvenţiere, pe baza figurii 59.

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

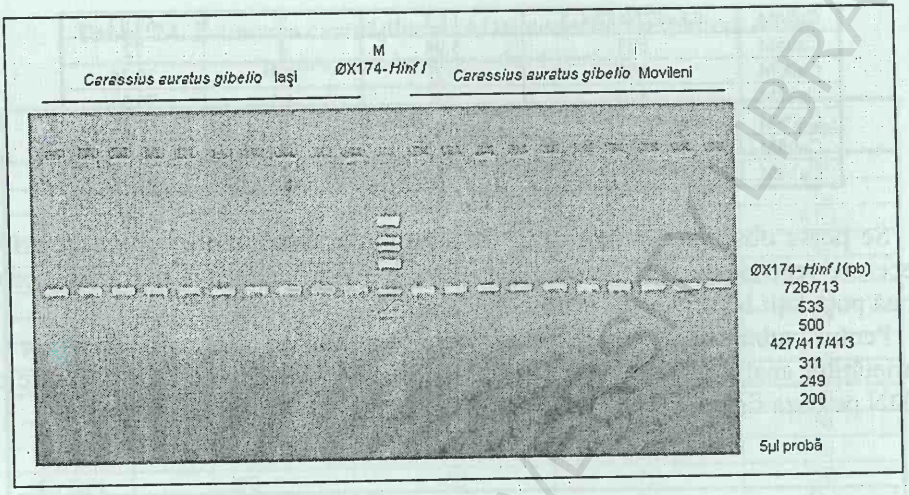


Figura 59. Electroforeză în gel de agaroză 3%, pentru ND4L, la indivizi ai genului *Carassius*

Tabel 26. Estimarea cantităților de ADN necesare secvențierii ND4L pentru indivizi ai genului *Cyprinus*

Nr. probă	Banda	Concentrația ADN (ng/ul)	Cantitatea de ADN (µl)	fmol
Cy01I	249	2,78	4,5	62,5
Cy02I	249	2,78	4,5	62,5
Cy03I	311	3,4	3,5	59,5
Cy04I	311	3,4	3,5	59,5
Cy05I	0,4x427/417/413	5,6	2,5	70
Cy06I	0,5x427/417/413	7	2	70
Cy07I	0,5x427/417/413	7	2	70
Cy08I	0,5x427/417/413	7	2	70
Cy09I	311	3,4	3,5	59,5
Cy10I	311	3,4	3,5	59,5
Cy01M	0,5x427/417/413	7	2	70
Cy02M	0,5x427/417/413	7	2	70
Cy03M	0,5x427/417/413	7	2	70
Cy04M	0,5x427/417/413	7	2	70
Cy05M	0,5x427/417/413	7	2	70
Cy06M	311	3,4	3,5	59,5
Cy07M	0,5x427/417/413	7	2	70

BCU CLUJ / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Nr. probă	Banda	Concentraţia ADN (ng/ul)	Cantitatea de ADN (µl)	fmol
Cy08M	0,5x427/417/413	7	2	70
Cy09M	0,5x427/417/413	7	2	70
Cy10M	0,5x427/417/413	7	2	70

Din tabelul 26 rezultă că s-au obţinut cantităţile de ADN necesare secvenţierii, cuprinse între 59,5 şi 70fmoli.

Se poate constata din tabelul 27 că, şi în acest caz, pentru indivizii genului *Carassius*, cantităţile de ADN obţinute pentru reacţia de secvenţiere a ND4L sunt mai mari decât în cazul varietăţilor genului *Cyprinus*.

Tabel 27. Estimarea cantităţilor de ADN necesare secvenţierii d-loop pentru indivizi ai genului *Carassius*

Nr. probă	Banda	Concentraţia ADN (ng/ul)	Cantitatea de ADN (µl)	fmol
Ca01I	0,7x427/417/413	9,8	1,5	73,5
Ca02I	0,8x427/417/413	11,2	1,5	84
Ca03I	0,8x427/417/413	11,2	1,5	84
Ca04I	0,7x427/417/413	9,8	1,5	73,5
Ca05I	0,7x427/417/413	9,8	1,5	73,5
Ca06I	0,8x427/417/413	11,2	1,5	84
Ca07I	0,7x427/417/413	9,8	1,5	73,5
Ca08I	0,7x249	1,94	7,5	72,75
Ca09I	0,7x249	1,94	7,5	72,75
Ca10I	0,5x249	1,39	7,5	52,12
Ca01M	0,7x427/417/413	9,8	1,5	73,5
Ca02M	0,7x427/417/413	9,8	1,5	73,5
Ca03M	0,7x427/417/413	9,8	1,5	73,5
Ca04M	0,7x427/417/413	9,8	1,5	73,5
Ca05M	0,7x427/417/413	9,8	1,5	73,5
Ca06M	0,7x427/417/413	9,8	1,5	73,5
Ca07M	0,8x427/417/413	11,2	1,5	84
Ca08M	0,8x427/417/413	11,2	1,5	84
Ca09M	0,8x427/417/413	11,2	1,5	84
Ca10M	0,7x427/417/413	9,8	1,5	73,5

BCU CLUJ CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

5.4. SECVENȚIEREA GENELOR CARE DEȚIN INFORMAȚIA SINTEZEI CITOCROMULUI B, A REGIUNII DE CONTROL MITOCONDRIAL ŞI A SUBUNITĂȚII 4L A DEHIDROGENAZEI

Secvențierea propriu-zisă a celor 3 gene luate în studiu pentru toți indivizii aparținând la două genuri, fiecare cu câte două populații diferite, s-a realizat cu ajutorul unui secvențiator Beckman Coulter cu 8 capilare. Pentru fiecare din cele trei gene, au fost secvențiate ambele catene (directă şi reversă), secvențele fiind obținute sub formă de fluorograme.

Toate fluorogramele au fost corectate utilizând programul CEQ 2000 DNA Analysis System, furnizat de Beckman Coulter. Această corectare este necesară pentru a verifica dacă citirea electronică a fost corectă şi a completa sau înlocui eventualele erori date de suprapunerea curbelor fluorogramei. Ulterior, secvențele corectate au fost exportate pentru aliniere în programul ESEE 32 (The Eyeball Sequence Editor), care a permis alinierea catenelor complementare pe baza secvențelor primerilor, tăierea şi unirea ambelor catene într-o unică secvență care are lungimea reală.

5.5. COMPARAREA SECVENȚELOR NUCLEOTIDICE ALE GENEI CARE DETERMINĂ SINTEZA CITOCROMULUI B, PROVENITE DE LA INDIVIZI APARȚINÂND GENULUI *CYPRINUS*

În cazul speciilor genului *Cyprinus*, pentru citocromul b, au fost aliniate cele 20 de secvențe (19 indivizi aparținând celor două populații şi 1 individ de crap-oglindă Cy06M), utilizând metoda Clustal V (Higgins şi Sharp, 1989) (Anexa 1).

Din alinierea secvențelor (Anexa 1) pentru 20 de indivizi ai genului *Cyprinus*, se constată că există un număr de 15 diferențe între cele douăzeci de secvențe.

Cele mai multe diferențe apar la individul de crap-oglindă (Cy06M). Astfel, pentru acesta au fost înregistrate un număr de 12 diferențe, dintre care 11 tranziții şi 1 transversie. Tranzițiile au fost observate în pozițiile: 177 (substituția citozinei cu timină); 198 şi 864 (substituția timinei cu citozină); 352, 568, 624, 693,897 şi 990 (substituția adeninei de guanină); 591 şi 732 (substituția guaninei de către adenină). Transversia s-a produs în poziția 870, unde a avut loc înlocuirea timinei de către adenină. În cazul acestei secvențe, se poate constata că rata de apariție a tranzițiilor este foarte mare comparativ cu cea de apariție a transversiilor.

Alte diferenţe au fost constatate pentru individul Cy03M (individ normal din populaţia Movileni) în cazul căruia s-a produs o transversie în poziţia 396, unde a fost substituită timina de către guanină; la indivizii Cy01M şi Cy04M s-a înregistrat o tranziţie în poziţia 507 (înlocuirea adeninei de către guanină) şi, în final, pentru individul Cy04I (din populaţia Iaşi), a avut loc o transversie în poziţia 432, unde a fost substituită adenina cu timină.

Referitor la restul indivizilor, se constată o rată destul de scăzută a diferenţelor existente între cele două populaţii.

Din cele prezentate anterior, putem concluziona că au fost găsite 5 noi haplotipuri pentru citocromul b: Cy06M pentru crapul oglindă din populaţia Mărgineni, Cy0104M şi Cy03M pentru crapul normal cu solzi, din aceeaşi populaţie, şi Cy04I pentru crapul cu solzi din populaţia Iaşi, fiind stabilit haplotipul general pentru cele două populaţii (dat de celelalte secvenţe care nu prezintă diferenţe).

Pe baza comparaţiei între secvenţe, s-a realizat tabelul similarităţii şi divergenţei (Tabel 28), din care se constată că procentele de similaritate sunt cuprinse între 98,9% (pentru secvenţele Cy06M şi restul care nu prezintă foarte multe diferenţe) şi 99,9% pentru secvenţele care diferă între ele doar printr-o singură nucleotidă.

Tabel 28. Procentele de similaritate şi divergenţă pentru secvenţele haplotipurilor stabilite

	Procent de similaritate						
Procent de divergenţă		Cy01I	Cy04I	Cy0104M	Cy03M	Cy06M	
	Cy01I		99,9	99,9	99,9	98,9	Cy01I
	Cy04I	0,1		99,8	99,8	98,9	Cy04I
	Cy03M	0,1	0,2		99,8	98,9	Cy03M
	Cy0104M	0,1	0,2	0,2		98,9	Cy0104M
	Cy06M	1,1	1,2	1,2	1,2		Cy06M
		Cy01I	Cy04I	Cy0104M	Cy03M	Cy06M	

BCU IAŞI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

În plus, pentru a stabili o mai clară diferenţiere între toate noile haplotipuri, au fost analizate numărul şi procentele în care se găsesc bazele azotate în fiecare dintre acestea (Tabel 29).

Tabel 29. Procentul bazelor azotate, în cadrul haplotipurilor stabilite

Baze azotate		Specii analizate				
		Cy01I	Cy04I	Cy0104M	Cy03M	Cy06M
A	Nr.	350	349	349	350	347
	%	30,70	30,60	30,60	30,70	30,44
G	Nr.	155	155	156	156	159
	%	13,60	13,60	13,68	13,68	13,95
T	Nr.	295	297	295	294	293
	%	25,88	26,0	25,88	25,79	25,70
C	Nr.	340	340	340	340	341
	%	29,82	20,80	29,82	29,82	29,91
A+T	Nr.	645	645	644	644	640
	%	56,58	56,58	56,49	56,49	56,14
C+G	Nr.	495	495	496	496	500
	%	43,42	43,42	43,51	43,51	43,86

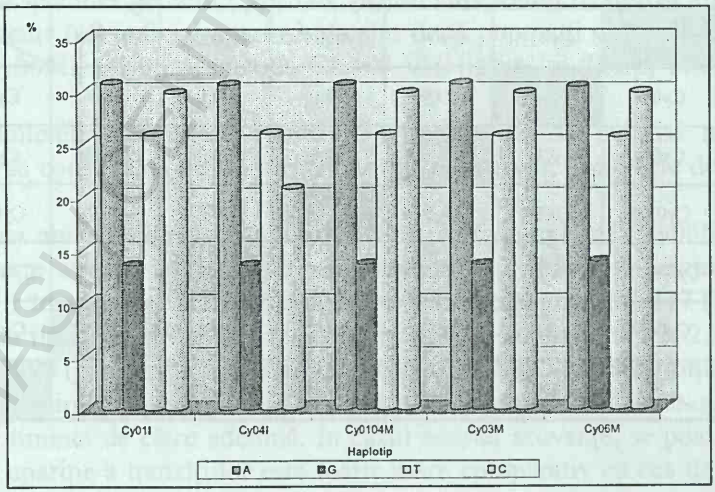


Figura 60. Graficul frecvenţei bazelor azotate în cadrul haplotipurilor caracterizate

BCU IAŞI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

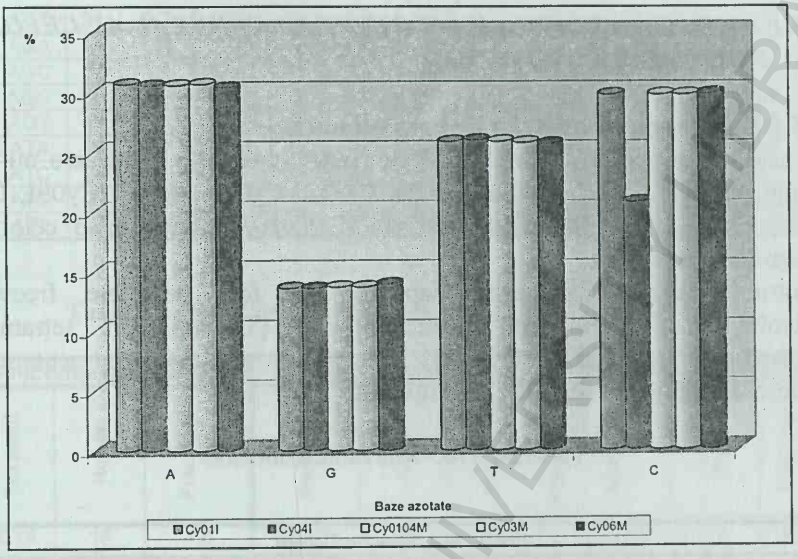


Figura 61. Graficul comparativ al frecvenţei bazelor azotate, pentru haplotipurile analizate

Din tabelul 29 şi figurile 60 şi 61, se poate observa că diferenţe majore se constată pentru secvenţa Cy06M, care prezintă valori diferite pentru toate bazele azotate, comparativ cu celelalte haplotipuri.

Referitor la cantitatea de adenină (A), aceasta este egală pentru Cy01I şi Cy03M (30,70%) şi pentru haplotipurile Cy04I – Cy0104M (30,60%). Cantitatea de guanină este aproximativ egală pentru toate haplotipurile, fiind cuprinsă între 13,60% (Cy01I şi Cy04I) şi 13,68% pentru Cy0104M şi Cy03M. De asemenea, se constată diferenţe şi pentru celelalte baze azotate: timina se găseşte în proporţie de 25,88% pentru Cy01I, Cy0104M, având valori diferite pentru celelalte haplotipuri, iar citozina, în proporţii aproximativ egale pentru toate haplotipurile.

Procentul de baze complementare este de 56,58% în cazul A+T pentru primele două haplotipuri şi 56,49% pentru Cy0104M şi Cy03M, pentru Cy06M fiind de 56,14%. Procentul de G+C este de 43,42% pentru primele două haplotipuri (Cy01I, Cy04I), de 43,51% pentru (Cy0104M, Cy03M) şi 43,86% pentru Cy06M.

5.5.1. CARACTERIZAREA HAPLOTIPULUI GENERAL AL CELOR DOUĂ POPULAȚII (CY01I)

5.5.1.1. Frecvențele tipurilor de asocieri nucleotide

În această categorie au fost încadrate toate secvențele între care nu există diferențe (Cy01I, Cy02I, Cy03I, Cy05I, Cy06I, Cy07I, Cy08I, Cy09I, Cy10I, Cy02M, Cy05M, Cy07M, Cy08M, Cy09M, Cy10M), aparținând celor două populații luate în studiu.

Pentru a caracteriza acest haplotip, au fost calculate frecvențele dinucleotidelor (Tabelul 30), trinucleotidelor (Tabelul 31), tetramerilor, pentamerilor şi hexamerilor (Tabelul 32), precum şi tetramerii, pentamerii şi hexamerii cu frecvență scăzută (Tabelul 33).

Tabel 30. Frecvența dinucleotidelor

Frecvența dinucleotidelor											
Dinucleotide	Număr	Frecvența (%)	Dinucleotide	Număr	Frecvența (%)	Dinucleotide	Număr	Frecvența (%)	Dinucleotide	Număr	Frecvența (%)
AA	90	7,9	CA	113	9,9	GA	52	4,6	TA	94	8,2
AC	117	10,3	CC	94	8,2	GC	44	3,9	TC	85	7,5
AG	48	4,2	CG	35	3,1	GG	26	2,3	TG	46	4,0
AT	95	8,3	CT	98	8,6	GT	33	2,9	TT	70	6,1

Tabel 31. Frecvența trinucleotidelor

Frecvența trinucleotidelor											
Trinucleotide	Număr	Frecvența (%)	Trinucleotide	Număr	Frecvența (%)	Trinucleotide	Număr	Frecvența (%)	Trinucleotide	Număr	Frecvența (%)
AAA	31	2,7	CAA	27	2,4	GAA	12	1,1	TAA	20	1,8
AAC	31	2,7	CAC	30	2,6	GAC	18	1,6	TAC	38	3,3
AAG	5	0,4	CAG	12	1,1	GAG	12	1,1	TAG	19	1,7
AAT	23	2,0	CAT	44	3,9	GAT	10	0,9	TAT	17	1,5
ACA	41	3,6	CCA	30	2,6	GCA	18	1,6	TCA	24	2,1
ACC	31	2,7	CCC	20	1,8	GCC	15	1,3	TCC	28	2,5
ACG	14	1,2	CCG	11	1,0	GCG	2	0,2	TCG	8	0,7

BCU CLUJ CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

ACT	31	2,7	CCT	33	2,9	GCT	9	0,8	TCT	25	2,2
AGA	14	1,2	CGA	9	0,8	GGA	13	1,1	TGA	16	1,4
AGC	12	1,1	CGC	14	1,2	GGC	7	0,6	TGC	11	1,0
AGG	10	0,9	CGG	5	0,4	GGG	2	0,2	TGG	9	0,8
AGT	12	1,1	CGT	7	0,6	GGT	4	0,4	TGT	10	0,9
ATA	19	1,7	CTA	42	3,7	GTA	15	1,3	TTA	18	1,6
ATC	28	2,5	CTC	24	2,1	GTC	5	0,4	TTC	28	2,5
ATG	20	1,8	CTG	11	1,0	GTG	3	0,3	TTG	12	1,1
ATT	28	2,5	CTT	21	1,8	GTT	10	0,9	TTT	11	1,0

Tabel 32. Frecvențele tetramerilor, pentamerilor și hexamerilor

Frecvența tetramerilor			Frecvența pentamerilor			Frecvența hexamerilor		
Tetrameri	Număr	Frecvența (%)	Pentameri	Număr	Frecvența (%)	Hexameri	Număr	Frecvența (%)
ACTA	18	1,6	TCCTA	10	0,9	TCTCAT	5	0,4
CCTA	17	1,5	TCTCA	8	0,7	TACTAC	5	0,4
TCCT	15	1,3	TACTA	8	0,7	CTACTA	5	0,4
CATC	15	1,3	ACTAC	8	0,7	TTCTTC	4	0,4
ACAT	15	1,3	TACAC	7	0,6	TTCTCA	4	0,4
CTAC	14	1,2	CATAC	7	0,6	TTCCTA	4	0,4
AACA	14	1,2	ATTCT	7	0,6	TCCTAT	4	0,4
AAAC	14	1,2	ACAAA	7	0,6	CTCCTA	4	0,4
TTCT	13	1,1	TTCTC	6	0,5	CCTATT	4	0,4
CAAA	13	1,1	CCTAT	6	0,5	CATTCT	4	0,4
ATTC	13	1,1	CATTC	6	0,5	CATACA	4	0,4
ACAC	13	1,1	CACTA	6	0,5	ACATCT	4	0,4
TCAT	12	1,1	CAAAC	6	0,5	TCCTAG	3	0,3
TACT	12	1,1	ACATC	6	0,5	TCATAC	3	0,3
TACA	12	1,1	AAACA	6	0,5	TATACT	3	0,3
CATT	12	1,1	TTCCT	5	0,4	TACTAG	3	0,3
TCTC	11	1,0	TACCA	5	0,4	TACAAA	3	0,3
CTCA	11	1,0	CTCCT	5	0,4	TAATTA	3	0,3
ATAC	11	1,0	CTCAT	5	0,4	GGACTA	3	0,3
ACCC	11	1,0	CTAGT	5	0,4	GACTAA	3	0,3

BCU IASI

Tabel 33. Tetrameri, pentameri şi hexameri cu frecvenţe scăzute

Tetrameri cu frecvenţă mică			Pentameri cu frecvenţă mică			Hexameri cu frecvenţă mică		
Tetrameri	Număr	Frecvenţa (%)	Pentameri	Număr	Frecvenţa (%)	Hexameri	Număr	Frecvenţa (%)
AAGT	1	0,1	AAAAA	1	0,1	AAAAAC	1	0,1
ACGT	1	0,1	AAAGC	1	0,1	AAAACT	1	0,1
AGCG	1	0,1	AAAGT	1	0,1	AAAATA	1	0,1
CAAG	1	0,1	AAATC	1	0,1	AAAATC	1	0,1
CAGG	1	0,1	AAATG	1	0,1	AAAATG	1	0,1
CCGG	1	0,1	AACGG	1	0,1	AAACAC	1	0,1
CGAC	1	0,1	AACTC	1	0,1	AAACAG	1	0,1
CGCT	1	0,1	AAGAA	1	0,1	AAACAT	1	0,1
CGTC	1	0,1	AAGAC	1	0,1	AAACCA	1	0,1
CGTT	1	0,1	AAGCA	1	0,1	AAACCC	1	0,1
CTCG	1	0,1	AAGCC	1	0,1	AAACTC	1	0,1
GCGA	1	0,1	AAGTC	1	0,1	AAAGAA	1	0,1
GCGC	1	0,1	AATAA	1	0,1	AAAGAC	1	0,1
GCTC	1	0,1	AATAT	1	0,1	AAAGCA	1	0,1
GGCG	1	0,1	AATCA	1	0,1	AAAGTC	1	0,1
GGGA	1	0,1	AATCT	1	0,1	AAATAA	1	0,1
GGGT	1	0,1	AATGC	1	0,1	AAATAT	1	0,1
GGTT	1	0,1	AATGT	1	0,1	AAATCG	1	0,1
GTAT	1	0,1	AATTG	1	0,1	AAATGA	1	0,1
GTCT	1	0,1	AATTT	1	0,1	AAATTA	1	0,1

Din tabelul 30 constatăm, referitor la procentele dinucleotidelor, că valoarea cea mai mare o are perechea AC (10,3%), iar valoarea cea mai mică perechea GG, în proporţie de 2,3%. Referitor la trinucleotide (Tabelul 31), cea mai mare frecvenţă o înregistrează tripletul CAT (3,9%), iar valoarea cea mai mică, tripletele GGG şi GCG, ambele având o frecvenţă de 0,2%.

Tetramerii cu frecvenţa cea mai mare sunt ACTA (1,6%), iar cei cu frecvenţa cea mai mică: TCTC, CTCA, ATAC, ACCC, toţi în procent de 1,0%. În cazul pentamerilor (Tabelul 32), cea mai mare frecvenţă o are pentamerul TCCTA (0,9%), iar cea mai mică frecvenţă o au TTCCT, TACCA, CTCCT, CTCAT şi CTAGT (0,4%). În ceea ce priveşte hexamerii, aceştia au frecvenţe cuprinse între 0,3% şi 0,4%.

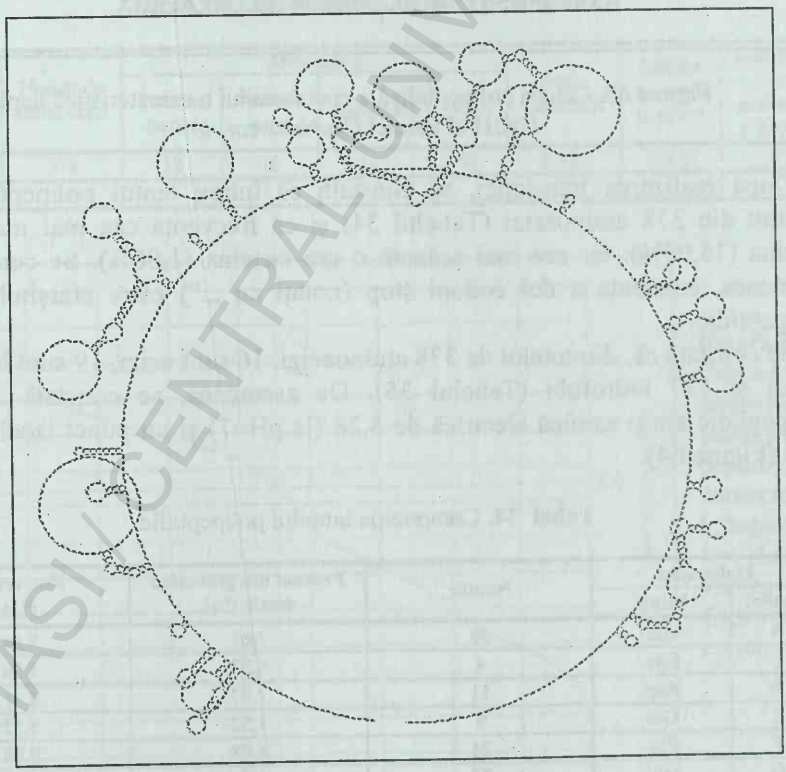
Tetramerii, pentamerii şi hexamerii cu frecvenţă scăzută sunt cei care se găsesc într-un singur exemplar în întreaga genă, având o frecvenţă de 0,1% (Tabel 33).

Cu ajutorul modulului EditSeq al DNA Star, a fost calculată temperatura de topire a ADN, după un model Davis-Botstein-Roth; în acest caz, prezintă o valoare de 82,26°C.

5.5.1.2. Modelarea structurii secundare ARNm

Este ştiut faptul că informaţia genetică este copiată de pe catena antisens a macromoleculei de ARN, de către o moleculă de ARN mesager. Acesta are o structură alternantă de porţiuni monocatenare şi bicatenare. Astfel, utilizând modulul GeneQuest al programului DNA Star, a fost modelată structura ARN (Figura 62), pe baza unei energii minime de –121,33. Datorită măririi imaginii, nu pot fi surprinse detaliile catenei; de aceea, au fost redate secvenţial (Anexa 2).

Figura 62. Modelarea structurii secundare a ARNm pentru haplotipul Cy01I al citocromului b, la specia *Cyprinus carpio* L.



BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Din figura 62 şi imaginile prezentate în Anexa 2, se poate observa existenţa a 46 porţiuni bicatenare, alternând cu 84 porţiuni monocatenare.

5.5.1.3. Translaţia şi caracterizarea catenei polipeptidice

Translaţia s-a realizat pe baza unui cod genetic mitocondrial pentru vertebrate, utilizând modulul EditSeq din cadrul programului DNA Star.

Catena polipeptidică obţinută este prezentată în figura 63.

```
MASLRKTHPL IKIANDALVD LPTPSNISAW WNFGSLLGLC LITQILTGLF
LAMHYTSDIS TAFSSVTHIC RDVNYGWLIR NVHANGASFF FICIYMHIAR
GLYYGSYLYK ETWNIGVILL LLVMMTAFVG YVLPWGQMSF WGATVITNLL
SAVPYMGDML VQWIWGGFSV DNATLTRFFA FHFLLPFVIT AATIIHLLFL
HETGSNNPIG LNSDADKVSF HPYFSYKDLL GFVIMLLALT LLALFSPNLL
GDPENFTPAN PLVTPPHIKP EWYFLFAYAI LRSIPNKLGG VLALLFSILV
LMVVPLLHTS KQRGLTFRPI TQFLFWTLVA DMIILTWIGG MPVEHLIMWH
          ASSYSPHSHY A.RC.MAMTA MLQNKALKWA
```

Figura 63. Catena polipeptidică a citocromului b caracteristică haplotipului Cy01I al speciei *Cyprinus carpio*

După realizarea translaţiei, se constată că întreg lanţul polipeptidic este alcătuit din 378 aminoacizi (Tabelul 34) şi că frecvenţa cea mai mare o are leucina (15,08%), iar cea mai scăzută o are cisteina (1,06%). Se constată, de asemenea, existenţa a doi codoni stop (notaţi cu „.") către sfârşitul lanţului polipeptidic.

Se constată că, din totalul de 378 aminoacizi, 16 sunt acizi, 19 sunt bazici, 92 polari şi 177 hidrofobi (Tabelul 35). De asemenea, se constată că lanţul polipeptidic are o sarcină electrică de 5,28 (la pH=7) şi un punct izoelectric de 8,42 (Figura 64).

Tabel 34. Compoziţia lanţului polipeptidic

Aminoacizi		Număr	Procent din greutatea totală (%)	Frecvenţa (%)
Simbol	Nume			
A	Ala	30	5,01	7,94
C	Cys	4	0,97	1,06
D	Asp	11	2,97	2,91
E	Glu	5	1,52	1,32
F	Phe	26	8,98	6,88
G	Gly	23	3,08	6,08
H	His	15	4,83	3,97

I	Ile	29	7,70	7,67
K	Lys	10	3,01	2,65
L	Leu	57	15,14	15,08
M	Met	16	4,93	4,23
N	Asn	17	4,55	4,50
P	Pro	20	4,56	5,29
Q	Gln	6	1,80	1,59
R	Arg	9	3,30	2,38
S	Ser	25	5,11	6,61
T	Thr	25	5,93	6,61
V	Val	22	5,12	5,82
W	Trp	13	5,68	3,44
Y	Tyr	15	5,75	3,97
B	Asx	0	0,00	0,00
Z	Glx	0	0,00	0,00
.	Ter	2	0,00	0,53

Tabel 35. Caracterizarea lanţului polipeptidic

Greutate moleculară (Daltoni)	Număr de aminoacizi	Aminoacizi				Punct izoelectric	Sarcina electrică la pH=7	Concentraţia la o extincţie =1 şi λ=280nm
		Puternic bazici	Puternic acizi	Hidrofobi	Polari			
42592,56	378	19	16	177	92	8,423	5,279	0,45

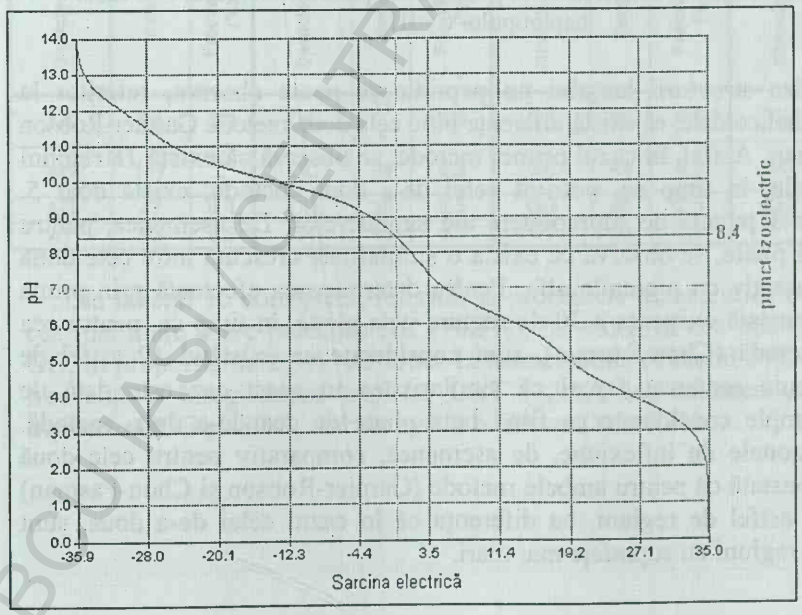


Figura 64. Curba de titrare pentru lanţul polipeptidic al citocromului b, haplotip Cy01I al speciei *Cyprinus carpio*

BCU IAŞI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Ulterior, a fost realizată o analiză a structurii proteinei (Figura 65); astfel, au fost determinate zonele alfa helicoidale, beta pliate şi de inflexiune, prin două metode: Garnier-Robson (Garnier *et al.*, 1978) şi Chou-Fasman (Chou şi Fasman, 1978); reprezentarea grafică a zonelor hidrofobe (Kyte şi Doolittle, 1982), zonele de flexie (Karplus şi Schultz, 1985), indexul antigenic (Jameson şi Wolf, 1988) şi graficul probabil al suprafeţei (Emini *et al.*, 1985).

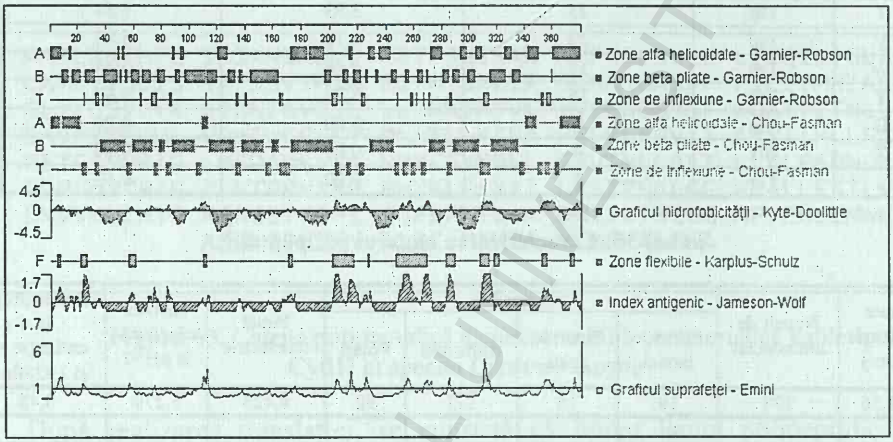


Figura 65. Analiza structurii lanţului polipeptidic pentru citocromul b în cazul haplotipului Cy01I

Din analiza structurii lanţului polipeptidic se poate observa, referitor la regiunile alfa helicoidale, că există diferenţe între cele două metode Garnier-Robson şi Chou-Fasman. Astfel, în cazul primei metode, se observă că există 18 regiuni alfa helicoidale, în timp ce, potrivit celei de-a doua metode, există doar 5, existând doar 3 puncte de suprapunere ale suprafeţelor. De asemenea, pentru regiunile beta pliate, se observă că există o similaritate crescută între cele două metode comparativ cu regiunile alfa. Pentru determinarea efectuată prin prima metodă, se constată existenţa a 30 de regiuni beta pliate, în timp ce, pentru cea de-a doua metodă (Chou-Fasman), sunt considerate ca existând 12 astfel de regiuni. Trebuie remarcat faptul că similaritatea în acest caz este dată de suprafeţele ample considerate ca fiind beta pliate de cea de-a doua metodă. Referitor la zonele de inflexiune, de asemenea, comparativ pentru cele două metode, se constată că pentru ambele metode (Garnier-Robson şi Chou-Fasman) sunt date 22 astfel de regiuni, cu diferenţa că în cazul celei de-a doua, sunt prezentate ca regiuni cu suprafeţe mai mari.

Pe baza graficului hidrofobicităţii (Figura 65) realizat după un model Kyte-Doolitle (Kyte şi Doolittle, 1982), se constată că există 15 zone hidrofobe şi 13 zone hidrofile.

Din graficul indexului antigenic calculat pe baza modelului Jameson-Wolf (Jameson şi Wolf, 1988), se constată existenţa a 23 de regiuni cu potenţial antigenic.

5.5.2. CARACTERIZAREA HAPLOTIPULUI CY04I

5.5.2.1. Frecvenţele tipurilor de asocieri nucleotidice

În acest haplotip intră o singură secvenţă care diferă de haplotipul general prin existenţa unei transversii (substituţia adeninei de către timină) în poziţia 432.

Pentru caracterizarea acestui haplotip, au fost calculate frecvenţele dinucleotidelor (Tabelul 36), trinucleotidelor (Tabelul 37), tetramerilor, pentamerilor şi hexamerilor (Tabelul 38), precum şi tetramerii, pentamerii şi hexamerii cu frecvenţă scăzută (Tabelul 39).

Tabel 36. Frecvenţa dinucleotidelor

Frecvenţa dinucleotidelor											
Dinucleotide	Număr	Frecvenţa (%)	Dinucleotide	Număr	Frecvenţa (%)	Dinucleotide	Număr	Frecvenţa (%)	Dinucleotide	Număr	Frecvenţa (%)
AA	90	7,9	CA	112	9,8	GA	52	4,6	TA	94	8,2
AC	117	10,3	CC	94	8,2	GC	44	3,9	TC	85	7,5
AG	47	4,1	CG	35	3,1	GG	26	2,3	TG	47	4,1
AT	95	8,3	CT	99	8,7	GT	33	2,9	TT	70	6,1

Din tabelul 36 constatăm, referitor la procentele dinucleotidelor, că valoarea cea mai mare o are perechea AC (10,3%), iar valoarea cea mai mică perechea GG, în proporţie de 2,3%. Referitor la trinucleotide (Tabelul 37), cea mai mare frecvenţă o înregistrează tripletul CAT (3,9%), iar valoarea cea mai mică, tripletele GGG şi GCG, ambele având o frecvenţă de 0,2%.

BCU "VASILE ALECSANDRI" UNIVERSITY LIBRARY

Tabel 37. Frecvenţa trinucleotidelor

Frecvenţa trinucleotidelor											
Trinucleotide	Număr	Frecvenţa (%)	Trinucleotide	Număr	Frecvenţa (%)	Trinucleotide	Număr	Frecvenţa (%)	Trinucleotide	Număr	Frecvenţa (%)
AAA	31	2,7	CAA	27	2,4	GAA	12	1,1	TAA	20	1,8
AAC	31	2,7	CAC	30	2,6	GAC	18	1,6	TAC	38	3,3
AAG	5	0,4	CAG	12	1,1	GAG	12	1,1	TAG	19	1,7
AAT	23	2,0	CAT	44	3,9	GAT	10	0,9	TAT	17	1,5
ACA	40	3,5	CCA	30	2,6	GCA	18	1,6	TCA	24	2,1
ACC	31	2,7	CCC	20	1,8	GCC	15	1,3	TCC	28	2,5
ACG	14	1,2	CCG	11	1,0	GCG	2	0,2	TCG	8	0,7
ACT	32	2,8	CCT	33	2,9	GCT	9	0,8	TCT	25	2,2
AGA	14	1,2	CGA	9	0,8	GGA	13	1,1	TGA	16	1,4
AGC	12	1,1	CGC	14	1,2	GGC	7	0,6	TGC	11	1,0
AGG	10	0,9	CGG	5	0,4	GGG	2	0,2	TGG	9	0,8
AGT	11	1,0	CGT	7	0,6	GGT	4	0,4	TGT	11	1.0
ATA	19	1,7	CTA	42	3,7	GTA	15	1,3	TTA	18	1,6
ATC	28	2,5	CTC	24	2,1	GTC	5	0,4	TTC	28	2,5
ATG	20	1,8	CTG	12	1,1	GTG	3	0,3	TTG	12	1,1
ATT	28	2,5	CTT	21	1,8	GTT	10	0,9	TTT	11	1,0

Tabel 38. Frecvenţele tetramerilor, pentamerilor şi hexamerilor

Frecvenţa tetramerilor			Frecvenţa pentamerilor			Frecvenţa hexamerilor		
Tetrameri	Număr	Frecvenţa (%)	Pentameri	Număr	Frecvenţa (%)	Hexameri	Număr	Frecvenţa (%)
ACTA	18	1,6	TCCTA	10	0,9	TCTCAT	5	0,4
CCTA	17	1,5	TCTCA	8	0,7	TACTAC	5	0,4
TCCT	15	1,3	TACTA	8	0,7	CTACTA	5	0,4
CATC	15	1,3	ACTAC	8	0,7	TTCTTC	4	0,4
ACAT	15	1,3	TACAC	7	0,6	TTCTCA	4	0,4
CTAC	14	1,2	CATAC	7	0,6	TTCCTA	4	0,4
AACA	14	1,2	ATTCT	7	0,6	TCCTAT	4	0,4
AAAC	14	1,2	ACAAA	7	0,6	CTCCTA	4	0,4
TTCT	13	1,1	TTCTC	6	0,5	CCTATT	4	0,4
CAAA	13	1,1	CCTAT	6	0,5	CATTCT	4	0,4
ATTC	13	1,1	CATTC	6	0,5	CATACA	4	0,4
ACAC	13	1,1	CACTA	6	0,5	ACATCT	4	0,4
TCAT	12	1,1	CAAAC	6	0,5	TCCTAG	3	0,3
TACT	12	1,1	ACATC	6	0,5	TCATAC	3	0,3
TACA	12	1,1	AAACA	6	0,5	TATACT	3	0,3
CATT	12	1,1	TTCCT	5	0,4	TACTAG	3	0,3
TCTC	11	1,0	TACCA	5	0,4	TACAAA	3	0,3
CTCA	11	1,0	CTCCT	5	0,4	TAATTA	3	0,3
ATAC	11	1,0	CTCAT	5	0,4	GGACTA	3	0,3
ACCC	11	1,0	CTAGT	5	0,4	GACTAA	3	0,3

BIBLIOTECA CENTRALĂ LIBRARY

Tetramerii cu frecvenţa cea mai mare sunt ACTA (1,6%), iar cei cu frecvenţa redusă: TCTC, CTCA, ATAC, ACCC, toţi în procent de 1,0%. În cazul pentamerilor (Tabelul 38), cea mai mare frecvenţă o are pentamerul TCCTA (0,9%), iar cea mai mică frecvenţă o au TTCCT, TACCA, CTCCT, CTCAT şi CTAGT (0,4%). În ceea ce priveşte hexamerii, aceştia au frecvenţe cuprinse între 0,3% şi 0,4%.

Tetramerii, pentamerii şi hexamerii cu frecvenţă scăzută, sunt cei care se găsesc într-un singur exemplar în întreaga genă, având o frecvenţă de 0,1% (Tabelul 39).

Cu ajutorul modulului EditSeq al DNA Star, a fost calculată temperatura de topire a secvenţei de ADN, după un model Davis-Botstein-Roth; în acest caz, prezintă o valoare de 82,26°C.

5.5.2.2. Modelarea structurii secundare a ARNm

Modelarea structurii ARN s-a realizat pe baza unei energii minime de –121,33 (aceeaşi ca şi în cazul haplotipului precedent). Deoarece nu există diferenţe majore care să modifice structura generală şi aspectul macromoleculei de ARN (tot 46 porţiuni bicatenare, alternând cu 84 porţiuni monocatenare), nu vor mai fi prezentate imaginile, cu specificarea că există o singură nucleotidă diferită comparativ cu haplotipul anterior (dacă în catena haplotipului anterior, în poziţia 432 se găsea adenină, în cazul de faţă, în aceeaşi poziţie se găseşte uracil).

5.5.2.3. Translaţia şi caracterizarea catenei polipeptidice

Translaţia s-a realizat pe baza codului genetic mitocondrial pentru vertebrate, utilizând modulul EditSeq din cadrul programului DNA Star (Figura 66).

```
MASLRKTHPL IKIANDALVD LPTPSNISAW WNFGSLLGLC LITQILTGLF
LAMHYTSDIS TAFSSVTHIC RDVNYGWLIR NVHANGASFF FICIYMHIAR
GLYYGSYLYK ETWNIGVILL LLVMMTAFVG YVLPWGQMSF WGATVITNLL
SAVPYMGDML VQWIWGGFSV DNATLTRFFA FHFLLPFVIT AATIIHLLFL
HETGSNNPIG LNSDADKVSF HPYFSYKDLL GFVIMLLALT LLALFSPNLL
GDPENFTPAN PLVTPPHIKP EWYFLFAYAI LRSIPNKLGG VLALLFSILV
LMVVPLLHTS KQRGLTFRPI TQFLFWTLVA DMIILTWIGG MPVEHLIMWH
          ASSYSPHSHY A.RC.MAMTA MLQNKALKWA
```

Figura 66. Catena polipeptidică a citocromului b caracteristică haplotipului Cy04I al speciei *Cyprinus carpio*

După realizarea translaţiei, se constată că întreg lanţul polipeptidic este alcătuit din 378 aminoacizi (Tabelul 39), din care frecvenţa cea mai mare o are leucina (15,08%), iar cea mai scăzută o are cisteina (1,06%). Se constată, de

asemenea, existența a doi codoni stop (notați cu „.") către sfârșitul lanțului polipeptidic, ceea ce corespunde cu structura lanțului polipeptidic al haplotipului anterior, de unde putem concluziona că în cazul de față, în poziția 432, s-a produs o mutație nonsens, deci, o mutație care nu determină o modificare a aminoacidului.

Tabel 39. Compoziția lanțului polipeptidic pentru haplotipul Cy04I

Aminoacizi		Număr	Procent din greutatea totală (%)	Frecvența (%)
Simbol	Nume			
A	Ala	30	5,01	7,94
C	Cys	4	0,97	1,06
D	Asp	11	2,97	2,91
E	Glu	5	1,52	1,32
F	Phe	26	8,98	6,88
G	Gly	23	3,08	6,08
H	His	15	4,83	3,97
I	Ile	29	7,70	7,67
K	Lys	10	3,01	2,65
L	Leu	57	15,14	15,08
M	Met	16	4,93	4,23
N	Asn	17	4,55	4,50
P	Pro	20	4,56	5,29
Q	Gln	6	1,80	1,59
R	Arg	9	3,30	2,38
S	Ser	25	5,11	6,61
T	Thr	25	5,93	6,61
V	Val	22	5,12	5,82
W	Trp	13	5,68	3,44
Y	Tyr	15	5,75	3,97
B	Asx	0	0,00	0,00
Z	Glx	0	0,00	0,00
.	Ter	2	0,00	0,53

BCU IAȘI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

5.5.3. CARACTERIZAREA HAPLOTIPULUI CY0104M

5.5.3.1. Frecvenţele tipurilor de asocieri nucleotidice

În acest haplotip, se încadrează 2 secvenţe (Cy01M şi Cy04M), care diferă de haplotipul general prin existenţa unor tranziţii (substituţia adeninei de către guanină) în poziţia 507.

Pentru caracterizarea acestui haplotip, au fost calculate frecvenţele dinucleotidelor (Tabelul 40), trinucleotidelor (Tabelul 41), tetramerilor, pentamerilor şi hexamerilor (Tabelul 42), precum şi tetramerii, pentamerii şi hexamerii cu frecvenţă scăzută (Tabelul 43).

Din Tabelul 40 constatăm, referitor la procentele dinucleotidelor, că valoarea cea mai mare o are perechea AC (10,3%), iar valoarea cea mai mică perechea GG, în proporţie de 2,4%. Referitor la trinucleotide (Tabelul 41), cea mai mare frecvenţă o înregistrează tripletul CAT (3,9%), iar valoarea cea mai mică, tripletele GGG şi GCG, ambele având o frecvenţă de 0,2%.

Tabel 40. Frecvenţa dinucleotidelor

Frecvenţa dinucleotidelor											
Dinucleotide	Număr	Frecvenţa (%)	Dinucleotide	Număr	Frecvenţa (%)	Dinucleotide	Număr	Frecvenţa (%)	Dinucleotide	Număr	Frecvenţa (%)
AA	90	7,9	CA	112	9,8	GA	52	4,6	TA	94	8,2
AC	117	10,3	CC	94	8,2	GC	44	3,9	TC	85	7,5
AG	47	4,1	CG	36	3,2	GG	27	2,4	TG	46	4,0
AT	95	8,3	CT	98	8,6	GT	33	2,9	TT	70	6,1

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Tabel 41. Frecvenţa trinucleotidelor

Frecvenţa trinucleotidelor											
Trinucleotide	Număr	Frecvenţa (%)	Trinucleotide	Număr	Frecvenţa (%)	Trinucleotide	Număr	Frecvenţa (%)	Trinucleotide	Număr	Frecvenţa (%)
AAA	31	2,7	CAA	27	2,4	GAA	12	1,1	TAA	20	1,8
AAC	31	2,7	CAC	30	2,6	GAC	18	1,6	TAC	38	3,3
AAG	5	0,4	CAG	11	1,0	GAG	12	1,1	TAG	19	1,7
AAT	23	2,0	CAT	44	3,9	GAT	10	0,9	TAT	17	1,5
ACA	41	3,6	CCA	30	2,6	GCA	18	1,6	TCA	23	2,0
ACC	31	2,7	CCC	20	1,8	GCC	15	1,3	TCC	28	2,5
ACG	14	1,2	CCG	11	1,0	GCG	2	0,2	TCG	9	0,8
ACT	31	2,7	CCT	33	2,9	GCT	9	0,8	TCT	25	2,2
AGA	14	1,2	CGA	9	0,8	GGA	13	1,1	TGA	16	1,4
AGC	12	1,1	CGC	14	1,2	GGC	7	0,6	TGC	11	1,0
AGG	10	0,9	CGG	6	0,5	GGG	2	0,2	TGG	9	0,8
AGT	11	1,0	CGT	7	0,6	GGT	5	0,4	TGT	10	0,9
ATA	19	1,7	CTA	42	3,7	GTA	15	1,3	TTA	18	1,6
ATC	28	2,5	CTC	24	2,1	GTC	5	0,4	TTC	28	2,5
ATG	20	1,8	CTG	11	1,0	GTG	3	0,3	TTG	12	1,1
ATT	28	2,5	CTT	21	1,8	GTT	10	0,9	TTT	11	1,0

Tabel 42. Frecvenţele tetramerilor, pentamerilor şi hexamerilor

Frecvenţa tetramerilor			Frecvenţa pentamerilor			Frecvenţa hexamerilor		
Tetrameri	Număr	Frecvenţa (%)	Pentameri	Număr	Frecvenţa (%)	Hexameri	Număr	Frecvenţa (%)
ACTA	18	1,6	TCCTA	10	0,9	TCTCAT	5	0,4
CCTA	17	1,5	TACTA	8	0,7	TACTAC	5	0,4
TCCT	15	1,3	ACTAC	8	0,7	CTACTA	5	0,4
CATC	15	1,3	TCTCA	7	0,6	TTCTTC	4	0,4
ACAT	15	1,3	TACAC	7	0,6	TTCCTA	4	0,4
CTAC	14	1,2	CATAC	7	0,6	TCCTAT	4	0,4
AACA	14	1,2	ATTCT	7	0,6	CTCCTA	4	0,4
AAAC	14	1,2	ACAAA	7	0,6	CCTATT	4	0,4
TTCT	13	1,1	TTCTC	6	0,5	CATTCT	4	0,4
CAAA	13	1,1	CCTAT	6	0,5	CATACA	4	0,4
ATTC	13	1,1	CATTC	6	0,5	ACATCT	4	0,4
ACAC	13	1,1	CACTA	6	0,5	TTCTCA	3	0,3
TCAT	12	1,1	CAAAC	6	0,5	TCCTAG	3	0,3
TACT	12	1,1	ACATC	6	0,5	TCATAC	3	0,3
TACA	12	1,1	AAACA	6	0,5	TATACT	3	0,3
CATT	12	1,1	TTCCT	5	0,4	TACTAG	3	0,3

BCU CENTRAL LIBRARY

TCTC	11	1,0	TACCA	5	0,4	TACAAA	3	0,3
ATAC	11	1,0	CTCCT	5	0,4	TAATTA	3	0,3
ACCC	11	1,0	CTCAT	5	0,4	GGACTA	3	0,3
TTCC	10	0,9	CTAGT	5	0,4	GACTAA	3	0,3

Tabel 43. Tetrameri, pentameri şi hexameri cu frecvenţe scăzute

Tetrameri cu frecvenţă mică			Pentameri cu frecvenţă mică			Hexameri cu frecvenţă mică		
Tetrameri	Număr	Frecvenţa (%)	Pentameri	Număr	Frecvenţa (%)	Hexameri	Număr	Frecvenţa (%)
AAGT	1	0,1	AAAAA	1	0,1	AAAAAC	1	0,1
ACGT	1	0,1	AAAGC	1	0,1	AAAACT	1	0,1
AGCG	1	0,1	AAAGT	1	0,1	AAAATA	1	0,1
CAAG	1	0,1	AAATC	1	0,1	AAAATC	1	0,1
CAGG	1	0,1	AAATG	1	0,1	AAAATG	1	0,1
CCGG	1	0,1	AACGG	1	0,1	AAACAC	1	0,1
CGAC	1	0,1	AACTC	1	0,1	AAACAG	1	0,1
CGCT	1	0,1	AAGAA	1	0,1	AAACAT	1	0,1
CGGT	1	0,1	AAGAC	1	0,1	AAACCA	1	0,1
CGTC	1	0,1	AAGCA	1	0,1	AAACCC	1	0,1
CGTT	1	0,1	AAGCC	1	0,1	AAACTC	1	0,1
GCGA	1	0,1	AAGTC	1	0,1	AAAGAA	1	0,1
GCGC	1	0,1	AATAA	1	0,1	AAAGAC	1	0,1
GCTC	1	0,1	AATAT	1	0,1	AAAGCA	1	0,1
GGCG	1	0,1	AATCA	1	0,1	AAAGTC	1	0,1
GGGA	1	0,1	AATCT	1	0,1	AAATAA	1	0,1
GGGT	1	0,1	AATGC	1	0,1	AAATAT	1	0,1
GGTA	1	0,1	AATGT	1	0,1	AAATCG	1	0,1
GGTT	1	0,1	AATTG	1	0,1	AAATGA	1	0,1
GTAT	1	0,1	AATTT	1	0,1	AAATTA	1	0,1

Tetramerul cu frecvenţa cea mai mare este ACTA (1,6%), iar cel cu frecvenţa redusă: TTCC în procent de 0,9%. În cazul pentamerilor (Tabelul 42), cea mai mare frecvenţă o are pentamerul TCCTA (0,9%), iar cea mai mică frecvenţă o au TTCCT, TACCA, CTCCT, CTCAT şi CTAGT (0,4%). În ceea ce priveşte hexamerii, aceştia au frecvenţe cuprinse între 0,3% şi 0,4%.

Tetramerii, pentamerii şi hexamerii cu frecvenţă scăzută (Tabelul 43) sunt cei care se găsesc într-un singur exemplar în întreaga genă, având o frecvenţă de 0,1%.

Cu ajutorul modulului EditSeq al DNA Star, a fost calculată temperatura de topire a ADN, după un model Davis-Botstein-Roth; în acest caz, prezintă o valoare de 82,30°C.

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

5.5.3.2. Modelarea structurii secundare a ARNm

Modelarea structurii ARN s-a realizat pe baza unei energii minime de –125,26 (diferite de haplotipurile precedente). Deoarece nu au fost înregistrate diferenţe majore care să modifice structura generală şi aspectul macromoleculei de ARN (tot 46 porţiuni bicatenare, alternând cu 84 porţiuni monocatenare), nu vor mai fi prezentate imaginile, cu specificarea că există o singură nucleotidă diferită comparativ cu haplotipul general (dacă în catena haplotipului general, în poziţia 507 se găsea adenină, în cazul de faţă, în aceeaşi poziţie se găseşte citozină).

5.5.3.3. Translaţia şi caracterizarea catenei polipeptidice

Translaţia s-a realizat pe baza codului genetic mitocondrial pentru vertebrate, utilizând modulul EditSeq din cadrul programului DNA Star (Figura 67).

```
MASLRKTHPL IKIANDALVD LPTPSNISAW WNFGSLLGLC LITQILTGLF
LAMHYTSDIS TAFSSVTHIC RDVNYGWLIR NVHANGASFF FICIYMHIAR
GLYYGSYLYK ETWNIGVILL LLVMMTAFVG YVLPWGQMSF WGATVITNLL
SAVPYMGDML VQWIWGGFSV DNATLTRFFA FHFLLPFVIT AATIIHLLFL
HETGSNNPIG LNSDADKVSF HPYFSYKDLL GFVIMLLALT LLALFSPNLL
GDPENFTPAN PLVTPPHIKP EWYFLFAYAI LRSIPNKLGG VLALLFSILV
LMVVPLLHTS KQRGLTFRPI TQFLFWTLVA DMIILTWIGG MPVEHLIMWH
          ASSYSPHSHY A.RC.MAMTA MLQNKALKWA
```

Figura 67. Catena polipeptidică a citocromului b caracteristică haplotipului Cy0104M al speciei *Cyprinus carpio*

După realizarea translaţiei, se constată că întreg lanţul polipeptidic este alcătuit din 378 aminoacizi (Tabelul 44), din care frecvenţa cea mai mare o are leucina (15,08%), iar cea mai scăzută o are cisteina (1,06%); aceste date arată că există o similaritate cu structura lanţului polipeptidic al haplotipului, de unde putem concluziona că şi în cazul de faţă, în poziţia 507, s-a produs o mutaţie nonsens, deci, o mutaţie care nu determină o modificare a aminoacidului.

Tabel 44. Compoziţia lanţului polipeptidic pentru haplotipul Cy0104M

Aminoacizi		Număr	Procent din greutatea totală (%)	Frecvenţa (%)
Simbol	Nume			
A	Ala	30	5,01	7,94
C	Cys	4	0,97	1,06
D	Asp	11	2,97	2,91
E	Glu	5	1,52	1,32
F	Phe	26	8,98	6,88
G	Gly	23	3,08	6,08
H	His	15	4,83	3,97
I	Ile	29	7,70	7,67
K	Lys	10	3,01	2,65
L	Leu	57	15,14	15,08
M	Met	16	4,93	4,23
N	Asn	17	4,55	4,50
P	Pro	20	4,56	5,29
Q	Gln	6	1,80	1,59
R	Arg	9	3,30	2,38
S	Ser	25	5,11	6,61
T	Thr	25	5,93	6,61
V	Val	22	5,12	5,82
W	Trp	13	5,68	3,44
Y	Tyr	15	5,75	3,97
B	Asx	0	0,00	0,00
Z	Glx	0	0,00	0,00
.	Ter	2	0,00	0,53

5.5.4. CARACTERIZAREA HAPLOTIPULUI CY03M

5.5.4.1. Frecvenţele tipurilor de asocieri nucleotidice

În acest haplotip se încadrează o singură secvenţă (Cy03M) care diferă de haplotipul general prin existenţa unei transversii (substituţia timinei de către guanină) în poziţia 396.

Pentru caracterizarea acestui haplotip, au fost calculate frecvenţele dinucleotidelor (Tabelul 45), trinucleotidelor (Tabelul 46), tetramerilor, pentamerilor şi hexamerilor (Tabelul 47), precum şi tetramerii, pentamerii şi hexamerii cu frecvenţă scăzută (Tabelul 48).

Cu ajutorul modulului EditSeq al DNA Star, a fost calculată temperatura de topire a ADN, după un model Davis-Botstein-Roth; în acest caz, prezintă o valoare de 82,30°C.

Din tabelul 45 constatăm, referitor la procentele dinucleotidelor, că valoarea cea mai mare o are perechea AC (10,3%), iar valoarea cea mai mică perechea GG, în proporţie de 2,3%. Referitor la trinucleotide (Tabelul 46), cea mai mare

BCU CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

frecvenţă o înregistrează tripletul CAT (3,9%), iar valoarea cea mai mică, tripletele GGG şi GCG, ambele având o frecvenţă de 0,2%.

Tabel 45. Frecvenţa dinucleotidelor

Frecvenţa dinucleotidelor											
Dinucleotide	Număr	Frecvenţa (%)	Dinucleotide	Număr	Frecvenţa (%)	Dinucleotide	Număr	Frecvenţa (%)	Dinucleotide	Număr	Frecvenţa (%)
AA	90	7,9	CA	113	9,9	GA	52	4,6	TA	94	8,2
AC	117	10,3	CC	94	8,2	GC	45	3,9	TC	84	7,4
AG	48	4,2	CG	35	3,1	GG	26	2,3	TG	47	4,1
AT	95	8,3	CT	98	8,6	GT	33	2,9	TT	69	6,1

Tabel 46. Frecvenţa trinucleotidelor

Frecvenţa trinucleotidelor											
Trinucleotide	Număr	Frecvenţa (%)	Trinucleotide	Număr	Frecvenţa (%)	Trinucleotide	Număr	Frecvenţa (%)	Trinucleotide	Număr	Frecvenţa (%)
AAA	31	2,7	CAA	27	2,4	GAA	12	1,1	TAA	20	1,8
AAC	31	2,7	CAC	30	2,6	GAC	18	1,6	TAC	38	3,3
AAG	5	0,4	CAG	12	1,1	GAG	12	1,1	TAG	19	1,7
AAT	23	2,0	CAT	44	3,9	GAT	10	0,9	TAT	17	1,5
ACA	41	3,6	CCA	30	2,6	GCA	18	1,6	TCA	24	2,1
ACC	31	2,7	CCC	20	1,8	GCC	15	1,3	TCC	28	2,5
ACG	14	1,2	CCG	11	1,0	GCG	2	0,2	TCG	8	0,7
ACT	31	2,7	CCT	33	2,9	GCT	10	0,9	TCT	24	2,1
AGA	14	1,2	CGA	9	0,8	GGA	13	1,1	TGA	16	1,4
AGC	12	1,1	CGC	14	1,2	GGC	7	0,6	TGC	12	1,1
AGG	10	0,9	CGG	5	0,4	GGG	2	0,2	TGG	9	0,8
AGT	12	1,1	CGT	7	0,6	GGT	4	0,4	TGT	10	0,9
ATA	19	1,7	CTA	42	3,7	GTA	15	1,3	TTA	18	1,6
ATC	28	2,5	CTC	24	2,1	GTC	5	0,4	TTC	27	2,4
ATG	20	1,8	CTG	11	1,0	GTG	4	0,4	TTG	12	1,1
ATT	28	2,5	CTT	21	1,8	GTT	9	0,8	TTT	11	1,0

BCU IAŞI

Tabel 47. Frecvenţele tetramerilor, pentamerilor şi hexamerilor

Frecvenţa tetramerilor			Frecvenţa pentamerilor			Frecvenţa hexamerilor		
Tetrameri	Număr	Frecvenţa (%)	Pentameri	Număr	Frecvenţa (%)	Hexameri	Număr	Frecvenţa (%)
ACTA	18	1,6	TCCTA	10	0,9	CTCCAT	5	0,4
CCTA	17	1,5	TCTCA	8	0,7	TACTAC	5	0,4
TCCT	15	1,3	TACTA	8	0,7	CTACTA	5	0,4
CATC	15	1,3	ACTAC	8	0,7	TTCTCA	4	0,4
ACAT	15	1,3	TACAC	7	0,6	TTCCTA	4	0,4
CTAC	14	1,2	CATAC	7	0,6	TCCTAT	4	0,4
AACA	14	1,2	ATTCT	7	0,6	CTCCTA	4	0,4
AAAC	14	1,2	ACAAA	7	0,6	CCTATT	4	0,4
CAAA	13	1,1	TTCTC	6	0,5	CATTCT	4	0,4
ATTC	13	1,1	CCTAT	6	0,5	CATACA	4	0,4
ACAC	13	1,1	CATTC	6	0,5	ACATCT	4	0,4
TTCT	12	1,1	CACTA	6	0,5	TTCTTC	3	0,3
TCAT	12	1,1	CAAAC	6	0,5	TCCTAG	3	0,3
TACT	12	1,1	ACATC	6	0,5	TCATAC	3	0,3
TACA	12	1,1	AAACA	6	0,5	TATACT	3	0,3
CATT	12	1,1	TTCCT	5	0,4	TACTAG	3	0,3
TCTC	11	1,0	TACCA	5	0,4	TACAAA	3	0,3
CTCA	11	1,0	CTCCT	5	0,4	TAATTA	3	0,3
ATAC	11	1,0	CTCAT	5	0,4	GGACTA	3	0,3
ACCC	11	1,0	CTAGT	5	0,4	GACTAA	3	0,3

Tabel 48. Tetrameri, pentameri şi hexameri cu frecvenţe scăzute

Tetrameri cu frecvenţă mică			Pentameri cu frecvenţă mică			Hexameri cu frecvenţă mică		
Tetrameri	Număr	Frecvenţa (%)	Pentameri	Număr	Frecvenţa (%)	Hexameri	Număr	Frecvenţa (%)
AAGT	1	0,1	AAAAA	1	0,1	AAAAAC	1	0,1
ACGT	1	0,1	AAAGC	1	0,1	AAAACT	1	0,1
AGCG	1	0,1	AAAGT	1	0,1	AAAATA	1	0,1
CAAG	1	0,1	AAATC	1	0,1	AAAATC	1	0,1
CAGG	1	0,1	AAATG	1	0,1	AAAATG	1	0,1
CCGG	1	0,1	AACGG	1	0,1	AAACAC	1	0,1
CGAC	1	0,1	AACTC	1	0,1	AAACAG	1	0,1
CGCT	1	0,1	AAGAA	1	0,1	AAACAT	1	0,1
CGTC	1	0,1	AAGAC	1	0,1	AAACCA	1	0,1
CGTT	1	0,1	AAGCA	1	0,1	AAACCC	1	0,1
CTCG	1	0,1	AAGCC	1	0,1	AAACTC	1	0,1
GCGA	1	0,1	AAGTC	1	0,1	AAAGAA	1	0,1

BCU IASI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

GCGC	1	0,1	AATAA	1	0,1	AAAGAC	1	0,1
GCTC	1	0,1	AATAT	1	0,1	AAAGCA	1	0,1
GGCG	1	0,1	AATCA	1	0,1	AAAGTC	1	0,1
GGGA	1	0,1	AATCT	1	0,1	AAATAA	1	0,1
GGGT	1	0,1	AATGC	1	0,1	AAATAT	1	0,1
GGTT	1	0,1	AATGT	1	0,1	AAATCG	1	0,1
GTAT	1	0,1	AATTG	1	0,1	AAATGA	1	0,1
GTCT	1	0,1	AATTT	1	0,1	AAATTA	1	0,1

Tetramerul cu frecvenţa cea mai mare este ACTA (1,6%), iar cei cu frecvenţa redusă sunt: TCTC, CTCA, ATAC, ACCC, toţi având o frecvenţă de 1,0%. În cazul pentamerilor (Tabelul 47), cea mai mare frecvenţă o are pentamerul TCCTA (0,9%), iar cea mai mică frecvenţă o au TTCCT, TACCA, CTCCT, CTCAT şi CTAGT (0,4%). În ceea ce priveşte hexamerii, aceştia au frecvenţe cuprinse între 0,3% şi 0,4%.

Tetramerii, pentamerii şi hexamerii cu frecvenţă scăzută (Tabelul 48) sunt cei care se găsesc într-un singur exemplar în întreaga genă, având o frecvenţă de 0,1%.

5.5.4.2. Modelarea structurii secundare a ARNm ARNm

Modelarea structurii ARN s-a realizat pe baza unei energii minime de –123,09 (diferite de haplotipurile precedente). Din figura 68, se constată existenţa unor diferenţe faţă de haplotipul standard al celor două populaţii.

Din figura 68 şi Anexa 3, constatăm că ARNm pentru acest haplotip prezintă 91 regiuni monocatenare, alternând cu 48 de regiuni bicatenare.

5.5.4.3. Translaţia şi caracterizarea catenei polipeptidice

Translaţia s-a realizat pe baza codului genetic mitocondrial pentru vertebrate, utilizând modulul EditSeq din cadrul programului DNA Star (Figura 69).

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

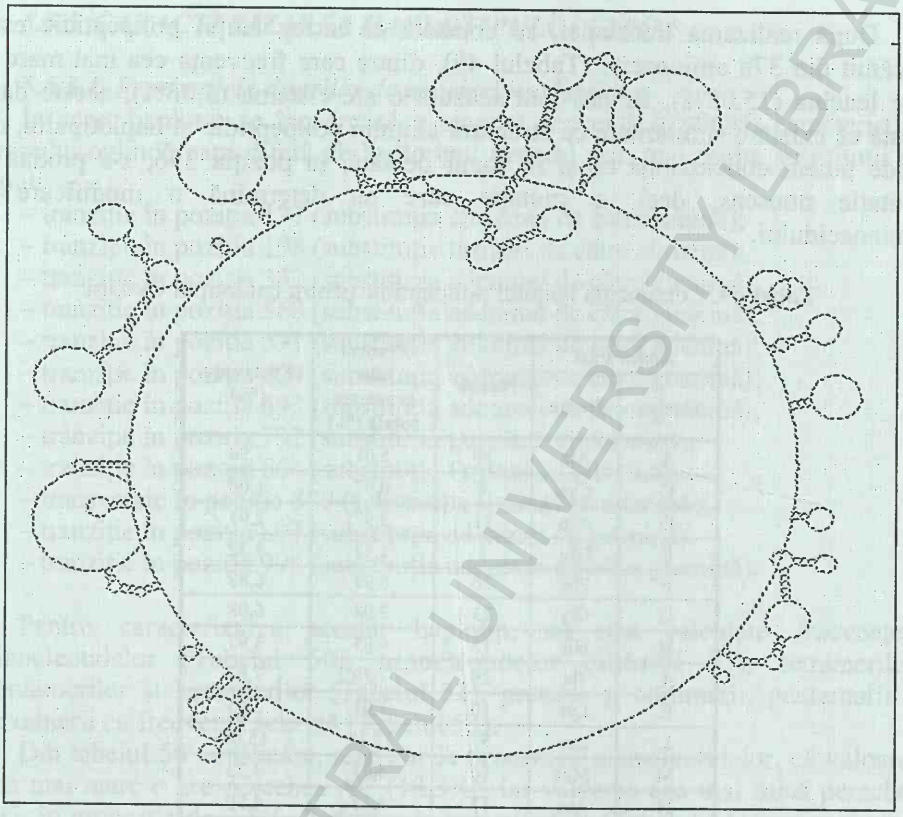


Figura 68. Modelarea structurii secundare a ARNm pentru haplotipul Cy03M al citocromului b, la specia *Cyprinus carpio*

```
MASLRKTHPL IKIANDALVD LPTPSNISAW WNFGSLLGLC LITQILTGLF
LAMHYTSDIS TAFSSVTHIC RDVNYGWLIR NVHANGASFF FICIYMHIAR
GLYYGSYLYK ETWNIGVILL LLVMMTAFVG YVLPWGQMSF WGATVITNLL
SAVPYMGDML VQWIWGGFSV DNATLTRFFA FHFLLPFVIT AATIIHLLFL
HETGSNNPIG LNSDADKVSF HPYFSYKDLL GFVIMLLALT LLALFSPNLL
GDPENFTPAN PLVTPPHIKP EWYFLFAYAI LRSIPNKLGG VLALLFSILV
LMVVPLLHTS KQRGLTFRPI TQFLFWTLVA DMIILTWIGG MPVEHLIMWH
          ASSYSPHSHY A.RC.MAMTA MLQNKALKWA
```

Figura 69. Catena polipeptidică a citocromului b caracteristică haplotipului Cy03M al speciei *Cyprinus carpio*

BCU IAŞI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

După realizarea translației, se constată că întreg lanțul polipeptidic este alcătuit din 378 aminoacizi (Tabelul 49), dintre care frecvența cea mai mare o are leucina (15,08%), iar cea mai scăzută o are cisteina (1,06%); aceste date arată că există o similaritate cu structura lanțului polipeptidic al haplotipului, de unde putem concluziona că şi în cazul de față, în poziția 396, s-a produs o mutație nonsens, deci, o mutație care nu determină o modificare a aminoacidului.

Tabel 49. Compoziția lanțului polipeptidic pentru haplotipul Cy03M

Aminoacizi		Număr	Procent din greutatea totală (%)	Frecvența (%)
Simbol	Nume			
A	Ala	30	5,01	7,94
C	Cys	4	0,97	1,06
D	Asp	11	2,97	2,91
E	Glu	5	1,52	1,32
F	Phe	26	8,98	6,88
G	Gly	23	3,08	6,08
H	His	15	4,83	3,97
I	Ile	29	7,70	7,67
K	Lys	10	3,01	2,65
L	Leu	57	15,14	15,08
M	Met	16	4,93	4,23
N	Asn	17	4,55	4,50
P	Pro	20	4,56	5,29
Q	Gln	6	1,80	1,59
R	Arg	9	3,30	2,38
S	Ser	25	5,11	6,61
T	Thr	25	5,93	6,61
V	Val	22	5,12	5,82
W	Trp	13	5,68	3,44
Y	Tyr	15	5,75	3,97
B	Asx	0	0,00	0,00
.	Ter	2	0,00	0,53

BCU IASI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

5.5.5. CARACTERIZAREA HAPLOTIPULUI CY06M

5.5.5.1. Frecvenţele tipurilor de asocieri nucleotidice

În acest haplotip se încadrează o singură secvenţă (Cy06M) caracteristică crapului-oglindă care diferă de haplotipul general prin mai multe substituţii de tipul:

– tranziţie în poziţia 177 (substituţia citozinei de către timină);
– tranziţie în poziţia 198 (substituţia timinei de către citozină);
– tranziţie în poziţia 352 (substituţia adeninei de către guanină);
– tranziţie în poziţia 568 (substituţia adeninei de către guanină);
– tranziţie în poziţia 591 (substituţia guaninei de către adenină);
– tranziţie în poziţia 624 (substituţia adeninei de către guanină);
– tranziţie în poziţia 693 (substituţia adeninei de către guanină);
– tranziţie în poziţia 732 (substituţia guaninei cu adenină);
– tranziţie în poziţia 864 (substituţia timinei cu citozină);
– transversie în poziţia 870 (substituţia timinei cu adenină);
– tranziţie în poziţia 897 (substituţia adeninei cu guanină);
– tranziţie în poziţia 990 (substituţia adeninei de către guanină).

Pentru caracterizarea acestui haplotip, au fost calculate frecvenţele dinucleotidelor (Tabelul 50), trinucleotidelor (Tabelul 51), tetramerilor, pentamerilor şi hexamerilor (Tabelul 52), precum şi tetramerii, pentamerii şi hexamerii cu frecvenţă scăzută (Tabelul 53).

Din tabelul 50 constatăm, referitor la procentele dinucleotidelor, că valoarea cea mai mare o are perechea AC (10,3%), iar valoarea cea mai mică perechea GG, în proporţie de 2,5%. Referitor la trinucleotide (Tabelul 51), cea mai mare frecvenţă o înregistrează tripletul CAT (3,9%), iar valoarea cea mai mică, tripletul GTG, ambele având o frecvenţă de 0,2%.

Tetramerul cu frecvenţa cea mai mare este ACTA (1,7%), iar cei cu frecvenţa redusă sunt: CTAT, CACC, ATAC, ACCC, toţi având o frecvenţă de 1,0%. În cazul pentamerilor (Tabelul 52), cea mai mare frecvenţă o are pentamerul TCCTA (0,9%), iar cea mai mică frecvenţă o au TTCCT, TACCA şi CTCCT (0,4%). În ceea ce priveşte hexamerii, aceştia au frecvenţe cuprinse între 0,3% şi 0,4%.

Tetramerii, pentamerii şi hexamerii cu frecvenţă scăzută (Tabelul 53) sunt cei care se găsesc într-un singur exemplar în întreaga genă, având o frecvenţă de 0,1%.

Cu ajutorul modulului EditSeq al DNA Star, a fost calculată temperatura de topire a ADN, după un model Davis-Botstein-Roth; în acest caz, prezintă o valoare de 82,26°C.

Tabel 50. Frecvența dinucleotidelor

Frecvența dinucleotidelor											
Dinucleotide	Număr	Frecvența (%)	Dinucleotide	Număr	Frecvența (%)	Dinucleotide	Număr	Frecvența (%)	Dinucleotide	Număr	Frecvența (%)
AA	88	7,7	CA	112	9,8	GA	53	4,6	TA	93	8,2
AC	117	10,3	CC	94	8,2	GC	44	3,9	TC	86	7,5
AG	48	4,2	CG	38	3,3	GG	29	2,5	TG	44	3,9
AT	94	8,2	CT	97	8,5	GT	33	2,9	TT	70	6,1

Tabel 51. Frecvența trinucleotidelor

Frecvența trinucleotidelor											
Trinucleotide	Număr	Frecvența (%)	Trinucleotide	Număr	Frecvența (%)	Trinucleotide	Număr	Frecvența (%)	Trinucleotide	Număr	Frecvența (%)
AAA	31	2,7	CAA	26	2,3	GAA	12	1,1	TAA	19	1,7
AAC	31	2,7	CAC	31	2,7	GAC	18	1,6	TAC	37	3,2
AAG	5	0,4	CAG	11	1,0	GAG	13	1,1	TAG	19	1,7
AAT	21	1,8	CAT	44	3,9	GAT	10	0,9	TAT	18	1,6
ACA	41	3,6	CCA	29	2,5	GCA	17	1,5	TCA	25	2,2
ACC	30	2,6	CCC	20	1,8	GCC	16	1,4	TCC	28	2,5
ACG	14	1,2	CCG	12	1,1	GCG	3	0,3	TCG	9	0,8
ACT	32	2,8	CCT	33	2,9	GCT	8	0,7	TCT	24	2,1
AGA	13	1,1	CGA	10	0,9	GGA	14	1,2	TGA	16	1,4
AGC	12	1,1	CGC	14	1,2	GGC	7	0,6	TGC	11	1,0
AGG	10	0,9	CGG	7	0,6	GGG	3	0,3	TGG	9	0,8
AGT	13	1,1	CGT	7	0,6	GGT	5	0,4	TGT	8	0,7
ATA	19	1,7	CTA	43	3,8	GTA	15	1,3	TTA	16	1,4
ATC	26	2,3	CTC	24	2,1	GTC	7	0,6	TTC	29	2,5
ATG	20	1,8	CTG	10	0,9	GTG	2	0,2	TTG	12	1,1
ATT	29	2,5	CTT	20	1,8	GTT	9	0,8	TTT	12	1,1

BCU IASI

Tabel 52. Frecvenţele tetramerilor, pentamerilor şi hexamerilor

Frecvenţa tetramerilor			Frecvenţa pentamerilor			Frecvenţa hexamerilor		
Tetrameri	Număr	Frecvenţa (%)	Pentameri	Număr	Frecvenţa (%)	Hexameri	Număr	Frecvenţa (%)
ACTA	19	1,7	TCCTA	10	0,9	TCTCAT	5	0,4
CCTA	18	1,6	TACTA	8	0,7	TACTAC	5	0,4
TCCT	15	1,3	ATTCT	8	0,7	CTACTA	5	0,4
CTAC	15	1,3	ACTAC	8	0,7	TTCTTC	4	0,4
ACAT	15	1,3	TCTCA	7	0,6	TTCTCA	4	0,4
CATC	14	1,2	TACAC	7	0,6	TTCCTA	4	0,4
AACA	14	1,2	CATAC	7	0,6	TCCTAT	4	0,4
AAAC	14	1,2	CACTA	7	0,6	CTCCTA	4	0,4
TTCT	13	1,1	ACAAA	7	0,6	CTATTC	4	0,4
TACT	13	1,1	TTCTC	6	0,5	CCTATT	4	0,4
CATT	13	1,1	CTACT	6	0,5	CATTCT	4	0,4
CAAA	13	1,1	CCTAT	6	0,5	CATACA	4	0,4
ATTC	13	1,1	CCTAC	6	0,5	ATTCTC	4	0,4
ACAC	13	1,1	CATTC	6	0,5	TCCTAG	3	0,3
TCAT	12	1,1	CACCC	6	0,5	TCATAC	3	0,3
TACA	12	1,1	CAAAC	6	0,5	TCACCC	3	0,3
CTAT	11	1,0	AAACA	6	0,5	TATTCT	3	0,3
CACC	11	1,0	TTCCT	5	0,4	TATACT	3	0,3
ATAC	11	1,0	TACCA	5	0,4	TACTAG	3	0,3
ACCC	11	1,0	CTCCT	5	0,4	TACAAA	3	0,3

Tabel 53. Tetrameri, pentameri şi hexameri cu frecvenţe scăzute

Tetrameri cu frecvenţă mică			Pentameri cu frecvenţă mică			Hexameri cu frecvenţă mică		
Tetrameri	Număr	Frecvenţa (%)	Pentameri	Număr	Frecvenţa (%)	Hexameri	Număr	Frecvenţa (%)
AAGT	1	0,1	AAAAA	1	0,1	AAAAAC	1	0,1
ACGT	1	0,1	AAAGC	1	0,1	AAAACT	1	0,1
AGGT	1	0,1	AAAGT	1	0,1	AAAATA	1	0,1
CAAG	1	0,1	AAATC	1	0,1	AAAATC	1	0,1
CAGG	1	0,1	AAATG	1	0,1	AAAATG	1	0,1
CCGG	1	0,1	AACGG	1	0,1	AAACAC	1	0,1
CCTG	1	0,1	AAGAA	1	0,1	AAACAG	1	0,1
CGAC	1	0,1	AAGAC	1	0,1	AAACAT	1	0,1
CGCT	1	0,1	AAGCA	1	0,1	AAACCA	1	0,1
CGTC	1	0,1	AAGCC	1	0,1	AAACCC	1	0,1
CGTT	1	0,1	AAGTC	1	0,1	AAAGAA	1	0,1

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

CTGG	1	0,1	AATAA	1	0,1	AAAGAC	1	0,1
GAGT	1	0,1	AATAT	1	0,1	AAAGCA	1	0,1
GATT	1	0,1	AATCA	1	0,1	AAAGTC	1	0,1
GCAG	1	0,1	AATCC	1	0,1	AAATAA	1	0,1
GCGA	1	0,1	AATCG	1	0,1	AAATAT	1	0,1
GCGC	1	0,1	AATCT	1	0,1	AAATCG	1	0,1
GCGG	1	0,1	AATGC	1	0,1	AAATGA	1	0,1
GCTC	1	0,1	AATGT	1	0,1	AAATTA	1	0,1
GCTG	1	0,1	AATTG	1	0,1	AAATTT	1	0,1

5.5.5.2. Modelarea structurii secundare a ARNm

Modelarea structurii ARN s-a realizat pe baza unei energii minime de –129,55. Datorită faptului că este o varietate (crap-oglindă) a speciei *Cyprinus carpio*, prezintă numeroase diferenţe faţă de haplotipurile anterioare. Din figura 70, se constată existenţa unor diferenţe faţă de haplotipul standard al celor două populaţii.

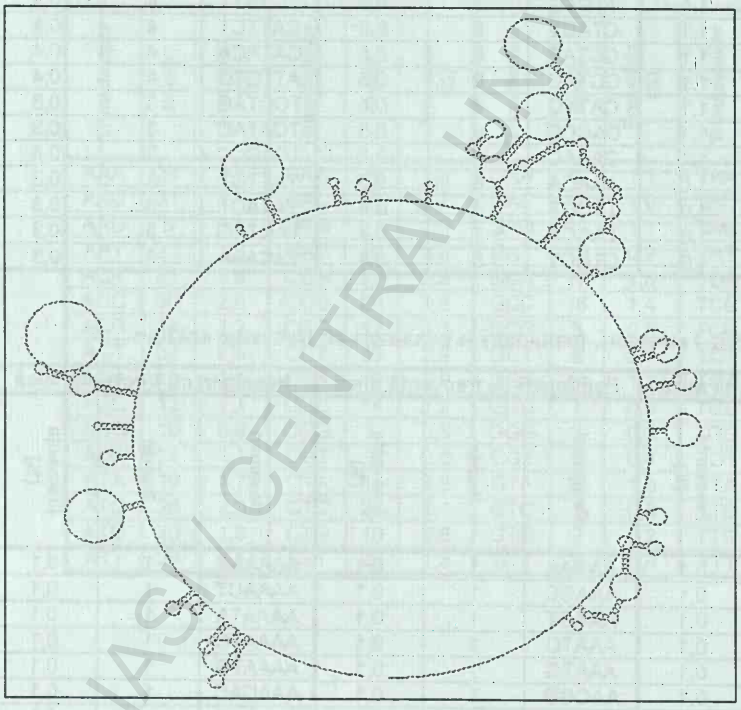


Figura 70. Modelarea structurii secundare a ARNm pentru haplotipul Cy06M al citocromului b, la specia *Cyprinus carpio*

BCU IAŞI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Din figura 70 şi Anexa 4, se observă că ARNm pentru secvenţa Cy06M, cuprinde 88 de porţiuni monocatenare şi 46 regiuni bicatenare.

5.5.5.3. Translaţia şi caracterizarea catenei polipeptidice

Translaţia s-a realizat pe baza unui cod genetic mitocondrial pentru vertebrate, utilizând modulul EditSeq din cadrul programului DNA Star.

Catena polipeptidică obţinută este prezentată în figura 71.

```
MASLRKTHPL IKIANDALVD LPTPSNISAW WNFGSLLGLC LITQILTGLF
LAMHYTSDIS TAFSSVTHIC RDVNYGWLIR NVHANGASFF FICIYMHIAR
GLYYGSYLYK ETWNIGVVLL LLVMMTAFVG YVLPWGQMSF WGATVITNLL
SAVPYMGDML VQWIWGGFSV DNATLTRFFA FHFLLPFVIA AATIIHLLFL
HETGSNNPIG LNSDADKVSF HPYFSYKDLL GFVIMLLALT LLALFSPNLL
GDPENFTPAN PLVTPPHIKP EWYFLFAYAI LRSIPNKLGG VLALLFSILV
LMVVPLLHTS KQRGLTFRPI TQFLFWTLVA DMIILTWIGG MPVEHLIMWH
          ASSYSPHSHY A.RC.MAMTA MLQNKALKWA
```

Figura 71. Catena polipeptidică a citocromului b caracteristică haplotipului Cy06M al speciei *Cyprinus carpio* var. crap-oglindă

Tabel 54. Compoziţia lanţului polipeptidic

Aminoacizi		Număr	Procent din greutatea totală (%)	Frecvenţa (%)
Simbol	Nume			
A	Ala	31	5,18	8,20
C	Cys	4	0,97	1,06
D	Asp	11	2,98	2,91
E	Glu	5	1,52	1,32
F	Phe	26	8,99	6,88
G	Gly	23	3,08	6,08
H	His	15	4,83	3,97
I	Ile	28	7,45	7,41
K	Lys	10	3,01	2,65
L	Leu	57	15,16	15,08
M	Met	16	4,93	4,23
N	Asn	17	4,56	4,50
P	Pro	20	4,57	5,29
Q	Gln	6	1,81	1,59
R	Arg	9	3,30	2,38
S	Ser	25	5,12	6,61

T	Thr	24	5,70	6,35
V	Val	23	5,36	6,08
W	Trp	13	5,69	3,44
Y	Tyr	15	5,57	3,97
B	Asx	0	0,00	0,00
.	Ter	2	0,00	0,53

După realizarea translației, se constată că întreg lanțul polipeptidic este alcătuit din 378 aminoacizi (Tabelul 54), din care se observă că frecvența cea mai mare o are leucina (15,16%), iar cea mai scăzută o are cisteina (1,06%). Se constată, de asemenea, existența a doi codoni stop (notați cu „.") către sfârșitul lanțului polipeptidic.

Se poate observa că din totalul de 378 aminoacizi, 16 sunt acizi, 19 sunt bazici, 91 polari şi 178 hidrofobi (Tabelul 55). De asemenea, se constată că lanțul polipeptidic are o sarcină electrică de 5,28 (la pH=7) şi un punct izoelectric de 8,42 (Figura 72).

Tabel 55. Caracterizarea lanțului polipeptidic

Greutate moleculară (Daltoni)	Număr de aminoacizi	Aminoacizi				Punct izoelectric	Sarcina electrică la pH=7	Concentrația la o extincție =1 şi λ=280nm
		Puternic bazici	Puternic acizi	Hidrofobi	Polari			
42548,51	378	19	16	178	91	8,423	5,279	0,45

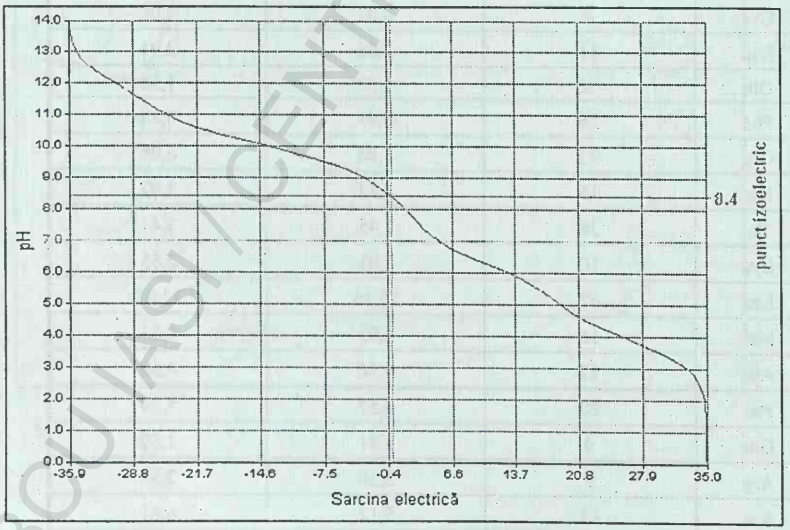


Figura 72. Curba de titrare pentru lanțul polipeptidic al citocromului b, haplotip Cy06M al speciei *Cyprinus carpio* var. crap-oglindă

BCU IAŞI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Ulterior, a fost realizată o analiză a structurii proteinei (Figura 73); astfel, au fost determinate zonele alfa helicoidale, beta pliate şi de inflexiune, prin două metode Garnier-Robson (Garnier *et al.*, 1978) şi Chou-Fasman (Chou şi Fasman, 1978); reprezentarea grafică a zonelor hidrofobe (Kyte şi Doolittle, 1982), zonele de flexie (Karplus şi Schultz, 1985), indexul antigenic (Jameson şi Wolf, 1988) şi graficul probabil al suprafeţei (Emini *et al.*, 1985).

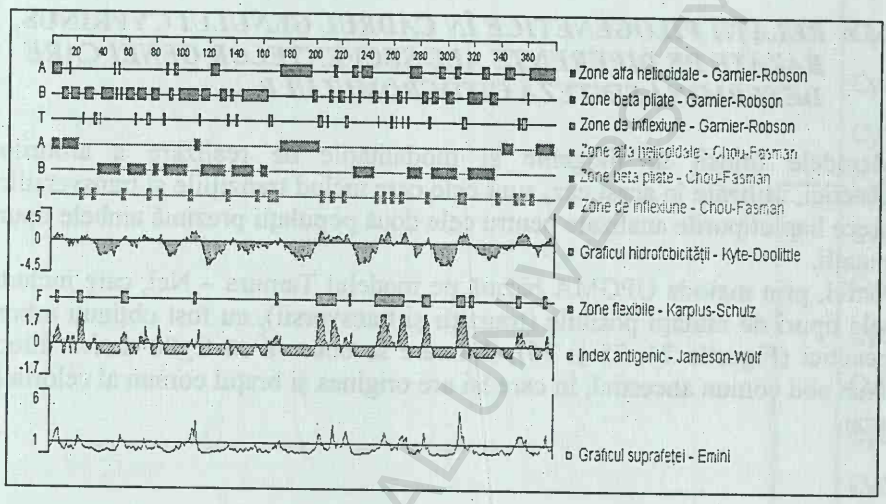


Figura 73. Analiza structurii lanţului polipeptidic pentru haplotipul Cy06M

Din analiza structurii lanţului polipeptidic se poate observa, referitor la regiunile alfa helicoidale, că şi în acest caz există diferenţe între cele două metode Garnier-Robson şi Chou-Fasman. Astfel, în cazul primei metode, se observă că există 17 regiuni alfa helicoidale, în timp ce, potrivit celei de-a doua metode, există doar 6, existând 5 puncte de suprapunere ale suprafeţelor comparativ între cele două metode. De asemenea, pentru regiunile beta pliate, se observă că, pentru determinarea efectuată cu ajutorul primei metode, se constată existenţa a 30 de regiuni beta pliate, în timp ce, pentru cea de-a doua metodă (Chou-Fasman), sunt considerate ca existând doar 11 astfel de regiuni. Trebuie remarcat faptul că similaritatea în acest caz este dată de suprafeţele ample considerate ca fiind beta pliate de cea de-a doua metodă. Referitor la zonele de inflexiune, de asemenea, comparativ pentru cele două metode (Garnier-Robson şi Chou-Fasman), sunt date 22 astfel de regiuni, cu diferenţa că în cazul celei de-a doua, sunt prezentate ca regiuni cu suprafeţe mai mari.

Pe baza graficului hidrofobicității (Figura 73) realizat după un model Kyte-Doolitle (Kyte şi Doolittle, 1982), se constată că există 15 zone hidrofobe şi 12 zone hidrofile.

Din graficul indexului antigenic calculat pe baza modelului Jameson-Wolf (Jameson şi Wolf, 1988), se constată existența a 26 de regiuni cu potențial antigenic.

5.5.6. RELAȚII FILOGENETICE ÎN CADRUL GENULUI CYPRINUS, *BAZATE PE DIFERENȚE ALE SECVENȚELOR GENEI CARE DETERMINĂ SINTEZA CITOCROMULUI B*

Metodele folosit în filogenie şi modalitățile de realizare a arborilor filogenetici, utilizate în acest caz, sunt cele care includ tranzițiile şi transversiile, deoarece haplotipurile analizate pentru cele două populații prezintă ambele tipuri de mutații.

Astfel, prin metoda UPGMA bazată pe modelul Tamura – Nei, care include ambele tipuri de mutații posibile (tranziții şi transversii), au fost obținuți arbori filogenetici (Figurile 74, 75 şi 76), din care se observă că Cy06 derivă direct dintr-un nod comun ancestral, în care îşi are originea şi brațul comun al celorlalți indivizi.

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

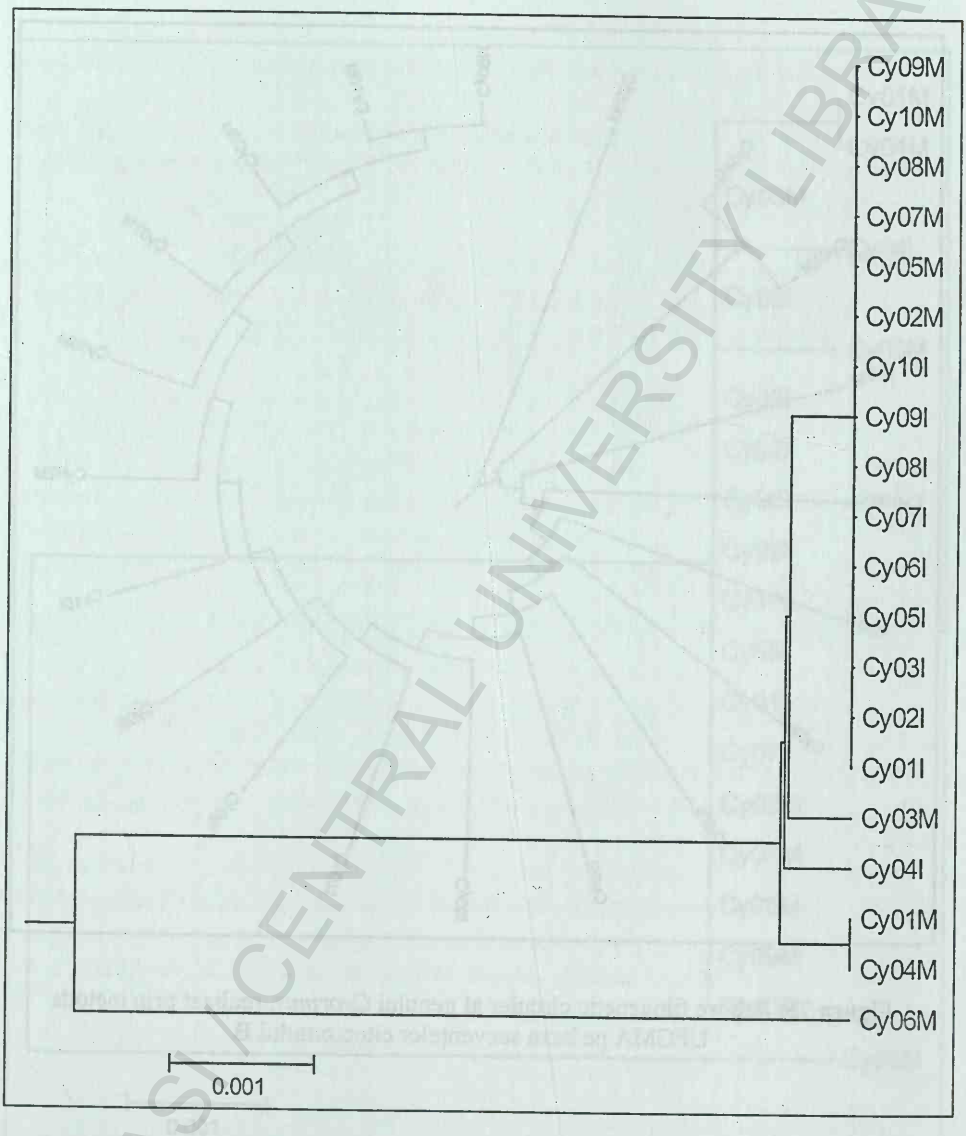


Figura 74. Arbore filogenetic rectangular al genului *Cyprinus*, realizat prin metoda UPGMA pe baza secvenţelor citocromului B

BCU IAŞI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

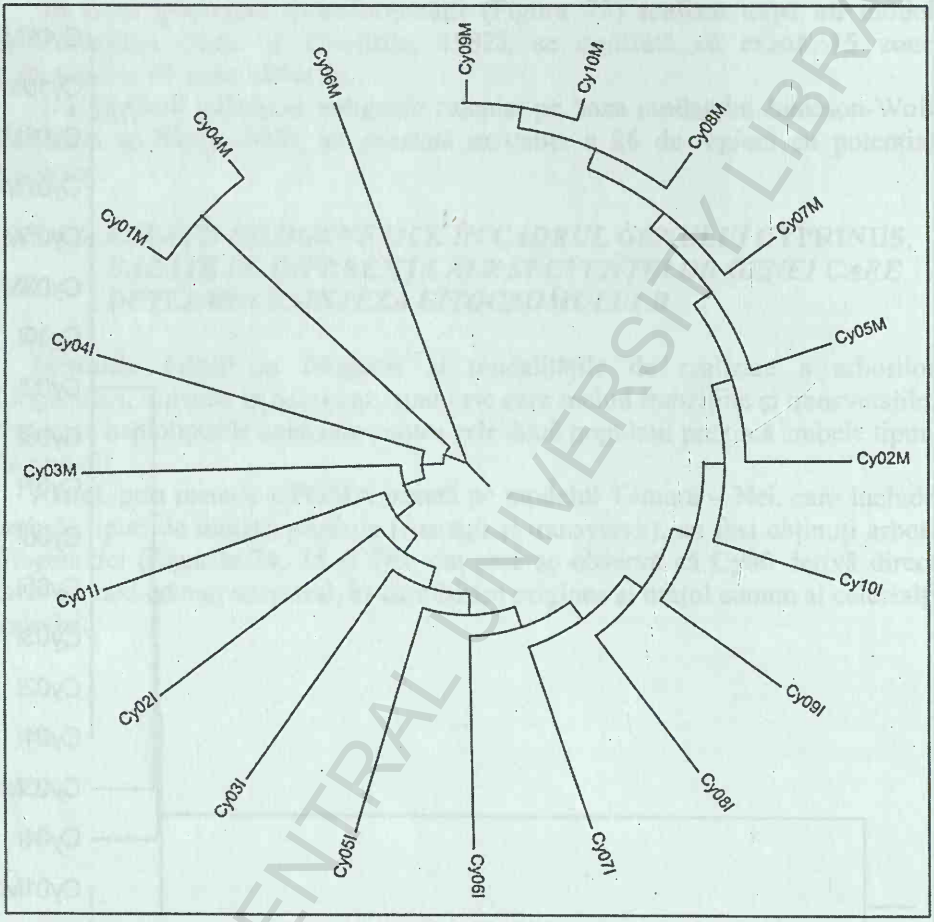


Figura 75. Arbore filogenetic circular al genului *Cyprinus*, realizat prin metoda UPGMA pe baza secvențelor citocromului B

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

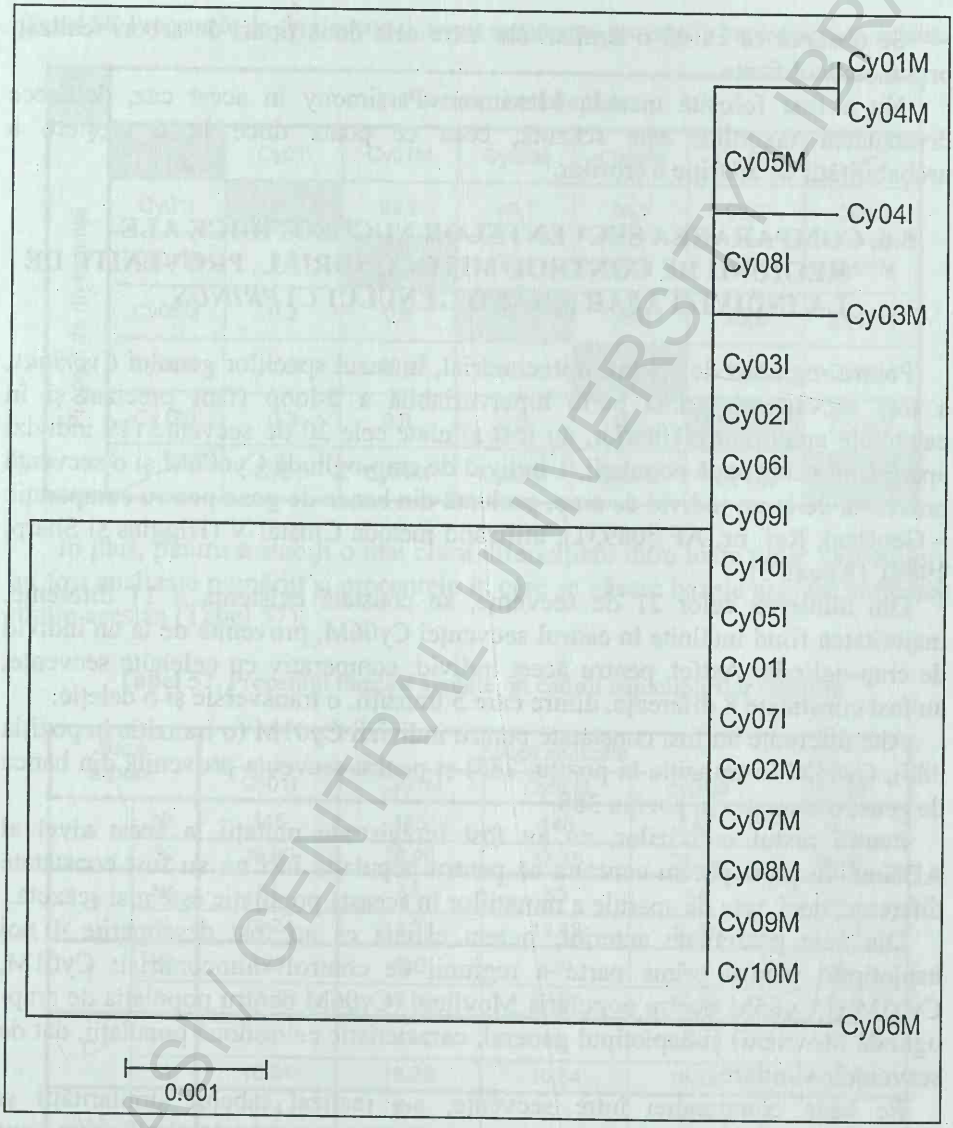


Figura 76. Arbore filogenetic rectangular al genului *Cyprinus*, realizat prin metoda evoluției minime (ME) după un model Neighbor-Joining, pe baza secvențelor citocromului B

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Se observă că există o similaritate între cele două tipuri de arbori realizaţi prin metode diferite.

Nu a fost folosită metoda Maximum Parsimony în acest caz, deoarece diversitatea taxonilor este scăzută, ceea ce poate duce la o creştere a probabilităţii de apariţie a erorilor.

5.6. COMPARAREA SECVENŢELOR NUCLEOTIDICE ALE REGIUNII DE CONTROL MITOCONDRIAL, PROVENITE DE LA INDIVIZI APARŢINÂND GENULUI *CYPRINUS*

Pentru regiunea de control mitocondrial, în cazul speciilor genului *Cyprinus*, a fost secvenţiată prima parte hipervariabilă a d-loop (fapt precizat şi în capitolele anterioare). Ulterior, au fost aliniate cele 20 de secvenţe (19 indivizi aparţinând celor două populaţii, 1 individ de crap-oglindă Cyo06M şi o secvenţă provenită de la un individ de crap, preluată din banca de gene pentru comparaţie – GenBank Ref. nr, AF 508931), utilizând metoda Clustal V (Higgins şi Sharp, 1989) (Anexa 5).

Din alinierea celor 21 de secvenţe, se constată existenţa a 11 diferenţe, majoritatea fiind întâlnite în cadrul secvenţei Cy06M, provenită de la un individ de crap-oglindă. Astfel, pentru acest individ, comparativ cu celelalte secvenţe, au fost constatate 8 diferenţe, dintre care 5 tranziţii, o transversie şi o deleţie.

Alte diferenţe au fost constatate pentru indivizii Cy01M (o tranziţie în poziţia 388), Cy05M (o tranziţie în poziţia 285) şi pentru secvenţa provenită din banca de gene, o tranziţie în poziţia 388.

Pentru restul indivizilor, nu au fost înregistrate mutaţii la acest nivel al ADNmt. În plus, putem constata că pentru populaţia Iaşi nu au fost constatate diferenţe, deci, rata de apariţie a mutaţiilor în această populaţie este mai scăzută.

Din cele prezentate anterior, putem estima că au fost descoperite 4 noi haplotipuri pentru prima parte a regiunii de control mitocondrial: Cy01M, Cy05M şi Cy06M pentru populaţia Movileni (Cy06M pentru populaţia de crap-oglindă Movileni) şi haplotipul general, caracteristic celor două populaţii, dat de secvenţele similare.

Pe baza comparaţiei între secvenţe, s-a realizat tabelul similarităţii şi divergenţei (Tabel 56), din care se constată că procentele de similaritate sunt cuprinse între 100% (pentru secvenţele Cy01M şi secvenţa preluată din banca de gene) şi 68,7% pentru secvenţa Cy06M şi celelalte secvenţe care constituie haplotipul general caracteristic celor două populaţii.

BCU "STEFAN CEL MARE" UNIVERSITY LIBRARY

Tabel 56. Procentele de similaritate şi divergenţă pentru secvenţele haplotipurilor stabilite

	Procent de similaritate						
Procent de divergenţă		Cy01I	Cy01M	Cy05M	Cy06M	Cy GB	
	Cy01I		99,7	99,7	68,7	99,7	Cy01I
	Cy01M	0,3		99,5	69,0	100	Cy01M
	Cy05M	0,3	0,5		69,0	99,5	Cy05M
	Cy06M	40,6	40,2	40,2		69,0	Cy06M
	Cy GB	0,3	0,0	0,5	40,2		Cy GB
		Cy01I	Cy01M	Cy05M	Cy06M	Cy GB	

În plus, pentru a stabili o mai clară diferenţiere între toate noile haplotipuri, au fost analizate numărul şi procentele în care se găsesc bazele azotate în fiecare dintre acestea (Tabel 57).

Tabel 57. Procentul bazelor azotate, în cadrul haplotipurilor stabilite

Baze azotate		Specii analizate				
		Cy01I	Cy01M	Cy05M	Cy06M	Cy GB
A	Nr.	145	145	146	143	145
	%	36,90	36,90	37,15	36,39	36,90
G	Nr.	54	54	53	55	54
	%	13,74	13,74	13,49	13,99	13,74
T	Nr.	129	130	129	131	130
	%	32,82	33,08	32,82	33,33	33,08
C	Nr.	65	64	65	64	64
	%	16,54	16,28	16,54	16,28	16,28
A+T	Nr.	274	275	275	274	275
	%	69,72	69,97	69,97	69,72	69,97
C+G	Nr.	119	118	118	119	118
	%	30,28	30,03	30,03	30,28	30,03

BCU "LUCIAN BLAGA" CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

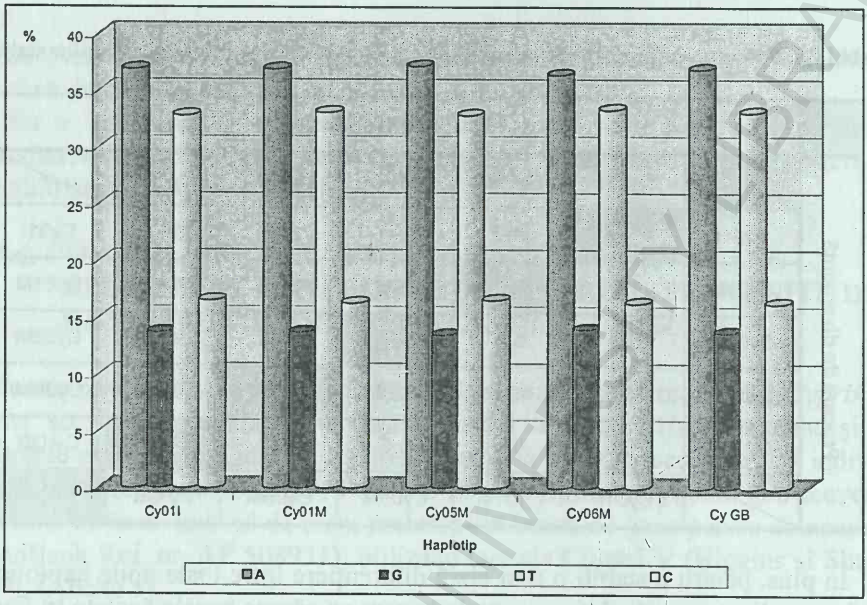


Figura 77. Graficul frecvenței bazelor azotate în cadrul haplotipurilor caracterizate

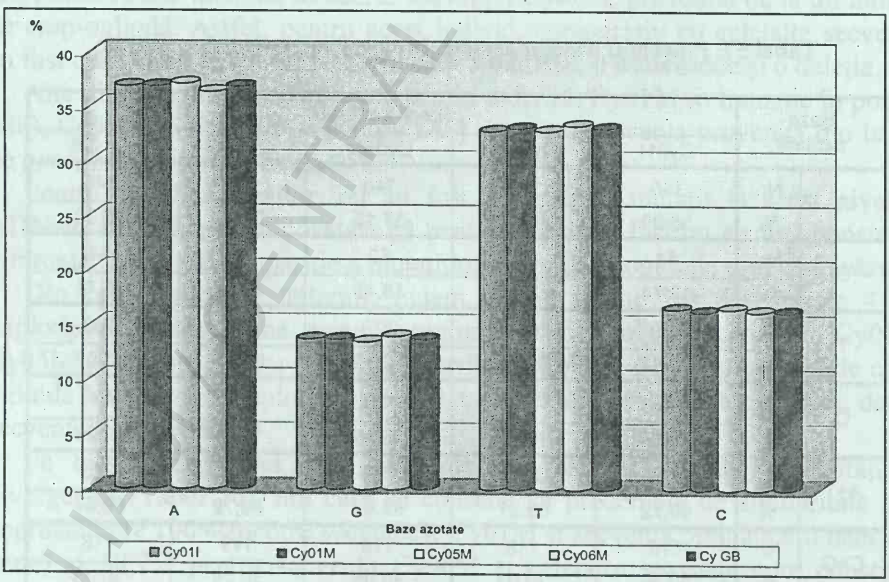


Figura 78. Graficul comparativ al frecvenței bazelor azotate, pentru haplotipurile analizate

BCU IAȘI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Din tabelul 57 şi figurile 77 şi 78, se poate observa că diferenţe majore se constată pentru secvenţa Cy06M, care prezintă valori diferite pentru trei dintre bazele azotate (A, G, T), comparativ cu celelalte haplotipuri.

Referitor la cantitatea de adenină (A), aceasta este egală pentru Cy01I, Cy01M şi Cy GB (36,90%), pentru haplotipul Cy05M se găseşte în proporţie de 37,15%, iar pentru Cy06M, în proporţie de 36,39%. Cantitatea de guanină este cuprinsă între 13,49% (Cy05M) şi 13,99 pentru Cy06M. De asemenea, se constată diferenţe şi pentru celelalte baze azotate: cantitatea de timină variază între 32,82% pentru Cy01I, Cy05M şi 33,33% pentru Cy06M, iar citozina, între 18,28% pentru Cy01I (ca reprezentant al haplotipului general caracteristic celor două populaţii), Cy06M şi Cy GB – 18,54% pentru haplotipurile Cy01I şi Cy05M.

Procentul de baze complementare este de 69,72% în cazul A+T pentru Cy01I şi Cy06M; 69,97% pentru celelalte trei haplotipuri. Procentul de G+C este de 30,28% (Cy01I, Cy06M) şi de 30,03% pentru Cy01M, Cy05M şi Cy GB.

5.6.1. CARACTERIZAREA HAPLOTIPULUI GENERAL AL CELOR DOUĂ POPULAŢII

5.6.1.1. Frecvenţele tipurilor de asocieri nucleotidice

În acest haplotip au fost încadrate toate secvenţele între care procentele de similaritate sunt de 100% (Cy01I, Cy02I, Cy03I, Cy04I, Cy05I, Cy06I, Cy07I, Cy08I, Cy09I, Cy10I, Cy02M, Cy03M, Cy04M, Cy07M, Cy08M, Cy09M, Cy10M), aparţinând celor două populaţii luate în studiu (Movileni şi Iaşi).

Pentru a caracteriza acest haplotip, au fost calculate frecvenţele dinucleotidelor (Tabelul 58), trinucleotidelor (Tabelul 59), tetramerilor, pentamerilor şi hexamerilor (Tabelul 60), precum şi tetramerii, pentamerii şi hexamerii cu frecvenţă scăzută (Tabelul 61).

Din tabelul 58 constatăm, referitor la procentele dinucleotidelor, că valoarea cea mai mare o are perechea AT (14,5%), iar valoarea cea mai mică perechea GC, în proporţie de 1,8%, fiind absente dinucleotidele de tipul CG.

Referitor la trinucleotide (Tabelul 59), cea mai mare frecvenţă o înregistrează tripletul TAT (6,6%), iar valoarea cea mai mică, tripletele GTC şi TGC, ambele având o frecvenţă de 0,3%.

Tabel 58. Frecvenţa dinucleotidelor

Frecvenţa dinucleotidelor											
Dinucleotide	Număr	Frecvenţa (%)	Dinucleotide	Număr	Frecvenţa (%)	Dinucleotide	Număr	Frecvenţa (%)	Dinucleotide	Număr	Frecvenţa (%)
AA	45	11.5	CA	31	7.9	GA	13	3,3	TA	55	14,0
AC	25	6.4	CC	15	3.8	GC	7	1,8	TC	18	4,6
AG	18	4.6	CG	0	0.0	GG	18	4,6	TG	19	4,8
AT	57	14.5	CT	19	4,8	GT	16	4,1	TT	37	9,4

Tabel 59. Frecvenţa trinucleotidelor

Frecvenţa trinucleotidelor											
Trinucleotide	Număr	Frecvenţa (%)	Trinucleotide	Număr	Frecvenţa (%)	Trinucleotide	Număr	Frecvenţa (%)	Trinucleotide	Număr	Frecvenţa (%)
AAA	13	3,3	CAA	9	2,3	GAA	5	1,3	TAA	17	4,3
AAC	9	2,3	CAC	6	1,5	GAC	3	0,8	TAC	7	1,8
AAG	7	1,8	CAG	3	0,8	GAG	3	0,8	TAG	5	1,3
AAT	16	4,1	CAT	13	3,3	GAT	2	0,5	TAT	26	6,6
ACA	9	2,3	CCA	7	1,8	GCA	7	1,8	TCA	8	2,0
ACC	5	1,3	CCC	4	1,0	GCC	0	0,0	TCC	6	1,5
ACG	0	0,0	CCG	0	0,0	GCG	0	0,0	TCG	0	0,0
ACT	11	2,8	CCT	4	1,0	GCT	0	0,0	TCT	4	1,0
AGA	4	1,0	CGA	0	0,0	GGA	2	0,5	TGA	7	1,8
AGC	3	0,8	CGC	0	0,0	GGC	3	0,8	TGC	1	0,3
AGG	6	1,5	CGG	0	0,0	GGG	6	1,5	TGG	6	1,5
AGT	5	1,3	CGT	0	0,0	GGT	6	1,5	TGT	5	1,3
ATA	21	5,4	CTA	8	2,0	GTA	10	2,6	TTA	16	4,1
ATC	8	2,0	CTC	4	1,0	GTC	1	0,3	TTC	5	1,3
ATG	9	2,3	CTG	3	0,8	GTG	2	0,5	TTG	5	1,3
ATT	19	4,8	CTT	4	1,0	GTT	3	0,8	TTT	11	2,8

BCU IAŞI UNIVERSITY LIBRARY

Tabel 60. Frecvenţele tetramerilor, pentamerilor şi hexamerilor

Frecvenţa tetramerilor			Frecvenţa pentamerilor			Frecvenţa hexamerilor		
Tetrameri	Număr	Frecvenţa (%)	Pentameri	Număr	Frecvenţa (%)	Hexameri	Număr	Frecvenţa (%)
TATT	14	3.6	TATTA	11	2,8	ATATTA	6	1,5
ATTA	12	3.1	ATATT	6	1,5	TATTAT	4	1,0
ATAT	12	3.1	CATAT	5	1,3	TATTAA	4	1,0
CATA	9	2.3	ATTAA	5	1,3	TACATA	3	0,8
TAAT	8	2.0	TACAT	4	1,0	TAATAT	3	0,8
ATAA	7	1.8	GCATA	4	1,0	GTACAT	3	0,8
TTAT	6	1.5	CTATT	4	1,0	CATATT	3	0,8
TTAA	6	1.5	CATAA	4	1,0	ATTAAT	3	0,8
TATA	6	1.5	ATTAT	4	1,0	ATAAAG	3	0,8
AACT	6	1.5	ATAAT	4	1,0	ACTATT	3	0,8
TACA	5	1.3	ACTAT	4	1,0	ACATAT	3	0,8
TAAA	5	1.3	ACATA	4	1,0	AACTAT	3	0,8
GCAT	5	1.3	AATAT	4	1,0	TTAATG	2	0,5
CTAT	5	1.3	AACTA	4	1,0	TGTATT	2	0,5
ATTT	5	1.3	TTAAT	3	0,8	TGAACT	2	0,5
ACTA	5	1.3	TATTT	3	0,8	TATTTT	2	0,5
ACCA	5	1.3	TATAT	3	0,8	TATTAC	2	0,5
ACAT	5	1.3	TAGTA	3	0,8	TAGTAC	2	0,5
AATA	5	1.3	TAATC	3	0,8	TAATGT	2	0,5
TTTT	4	1.0	TAATA	3	0,8	TAATCC	2	0,5

Tabel 61. Tetrameri, pentameri şi hexameri cu frecvenţe scăzute

Tetrameri cu frecvenţă mică			Pentameri cu frecvenţă mică			Hexameri cu frecvenţă mică		
Tetrameri	Număr	Frecvenţa (%)	Pentameri	Număr	Frecvenţa (%)	Hexameri	Număr	Frecvenţa (%)
AACA	1	0.3	AAAAT	1	0.3	AAAAAA	1	0.3
ACAC	1	0.3	AAACA	1	0.3	AAAAAT	1	0.3
ACTG	1	0.3	AAAGG	1	0.3	AAAATT	1	0.3
AGAA	1	0.3	AAATA	1	0.3	AAACAT	1	0.3
AGAG	1	0.3	AACAT	1	0.3	AAAGGC	1	0.3
AGGA	1	0.3	AACTC	1	0.3	AAATAA	1	0.3
AGGC	1	0.3	AACTT	1	0.3	AAATTC	1	0.3
AGTT	1	0.3	AAGAC	1	0.3	AACATA	1	0.3
ATGC	1	0.3	AAGAG	1	0.3	AACCAG	1	0.3

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

ATGG	1	0.3	AAGGA	1	0.3	AACCAT	1	0.3
ATTC	1	0.3	AAGGC	1	0.3	AACTAA	1	0.3
ATTG	1	0.3	AAGGT	1	0.3	AACTCA	1	0.3
CAAG	1	0.3	AATAA	1	0.3	AACTTG	1	0.3
CAGT	1	0.3	AATTC	1	0.3	AAGACT	1	0.3
CATG	1	0.3	ACAAA	1	0.3	AAGAGA	1	0.3
CATT	1	0.3	ACACA	1	0.3	AAGCAG	1	0.3
CCAC	1	0.3	ACATT	1	0.3	AAGCAT	1	0.3
CCAG	1	0.3	ACCAC	1	0.3	AAGGAC	1	0.3
CCCC	1	0.3	ACCAG	1	0.3	AAGGCA	1	0.3
CCCT	1	0.3	ACCAT	1	0.3	AAGGTG	1	0.3

Tetramerul cu frecvența cea mai mare este TATT (3,6%), iar cel cu frecvența cea mai mică TTTT, în procent de 1,0%. În cazul pentamerilor (Tabelul 60), cea mai mare frecvență o are pentamerul TATTA (2,8%), iar cea mai mică frecvență o au TTAAT, TATTT, TATAT, TAGTA, TAATC şi TAATA (0,8%). În ceea ce priveşte hexamerii, aceştia au frecvențe cuprinse între 1,5% (ATATTA) şi 0,5%.

Tetramerii, pentamerii şi hexamerii cu frecvență scăzută, sunt cei care se găsesc într-un singur exemplar în întreaga genă, având o frecvență de 0,3% (Tabelul 61).

Cu ajutorul modulului EditSeq al DNA Star, a fost calculată temperatura de topire a ADN, după un model Davis-Botstein-Roth; în acest caz, prezintă o valoare de 76,04°C.

5.6.1.2. Modelarea structurii secundare a ARNm

Utilizând modulul GeneQuest al programului DNA Star, a fost modelată structura ARN (Figura 79), pe baza unei energii minime de –49,0. Detaliile acestei imagini sunt prezentate în Anexa 6.

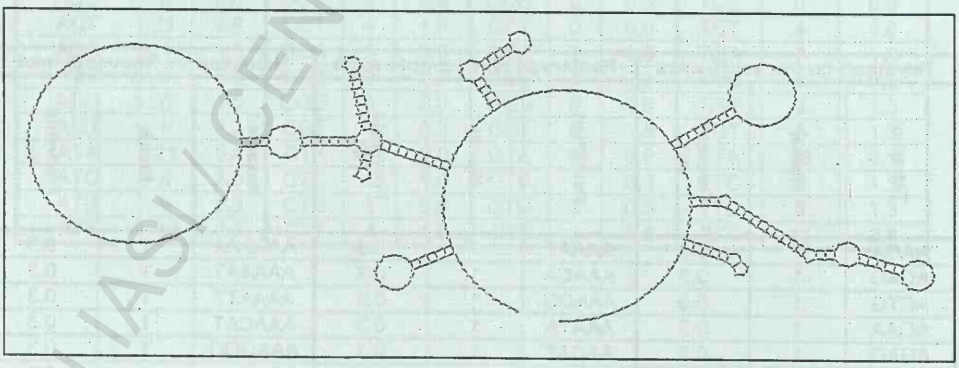


Figura 79. Modelarea structurii secundare a ARNm pentru haplotipul Cy01I al regiunii de control mitocondrial, la specia *Cyprinus carpio*

BCU IAŞI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Din figura 79 şi Anexa 6, putem constata existenţa a 31 de porţiuni monocatenare şi a 14 regiuni bicatenare.

5.6.2. CARACTERIZAREA HAPLOTIPULUI CY01M

5.6.2.1. Frecvenţele tipurilor de asocieri nucleotidice

În acest haplotip se încadrează o singură secvenţă Cy01M din populaţia Larga-Jijia – Mărgineni, caracteristică unui individ de tip sălbatic aparţinând speciei *Cyprinus carpio*. După cum s-a observat în tabelul de similaritate, această secvenţă este identică cu secvenţa preluată din banca de gene, ceea ce ne permite să concluzionăm că cele două populaţii studiate prezintă haplotipuri distincte de cele secvenţiate până acum, aflându-se în proces de speciaţie. În plus, se poate constata că mutaţia apărută în populaţiile studiate, datorită frecvenţei cu care apare, este deja fixată în genofondul acestora.

Pentru caracterizarea haplotipului, au fost calculate frecvenţele dinucleotidelor (Tabelul 62), trinucleotidelor (Tabelul 63), tetramerilor, pentamerilor şi hexamerilor (Tabelul 64), precum şi tetramerii, pentamerii şi hexamerii cu frecvenţă scăzută (Tabelul 65).

Din tabelul 62 constatăm, referitor la procentele dinucleotidelor, că valoarea cea mai mare o are perechea AT (14,8%), iar valoarea cea mai mică perechea GC, în proporţie de 1,8%; şi în acest caz sunt absente dinucleotidele CG. Referitor la trinucleotide (Tabelul 63), cea mai mare frecvenţă o înregistrează tripletul TAT (6,9%), iar valoarea cea mai mică, tripletele GTC şi TGC, ambele având o frecvenţă de 0,3%.

Tabel 62. Frecvenţa dinucleotidelor

Frecvenţa dinucleotidelor											
Dinucleotide	Număr	Frecvenţa (%)	Dinucleotide	Număr	Frecvenţa (%)	Dinucleotide	Număr	Frecvenţa (%)	Dinucleotide	Număr	Frecvenţa (%)
AA	45	11,5	CA	31	7,9	GA	13	3,3	TA	55	14,0
AC	24	6,1	CC	15	3,8	GC	7	1,8	TC	18	4,6
AG	18	4,6	CG	0	0,0	GG	18	4,6	TG	19	4,8
AT	58	14,8	CT	18	4,6	GT	16	4,1	TT	38	9,7

BCU IAŞI / CENTRUL VECHI / LIBRARY

Tabel 63. Frecvenţa trinucleotidelor

Frecvenţa trinucleotidelor											
Trinucleotide	Număr	Frecvenţa (%)	Trinucleotide	Număr	Frecvenţa (%)	Trinucleotide	Număr	Frecvenţa (%)	Trinucleotide	Număr	Frecvenţa (%)
AAA	13	3,3	CAA	9	2,3	GAA	5	1,3	TAA	17	4,3
AAC	9	2,3	CAC	6	1,5	GAC	3	0,8	TAC	6	1,5
AAG	7	1,8	CAG	3	0,8	GAG	3	0,8	TAG	5	1,3
AAT	16	4,1	CAT	13	3,3	GAT	2	0,5	TAT	27	6,9
ACA	9	2,3	CCA	7	1,8	GCA	7	1,8	TCA	8	2,0
ACC	5	1,3	CCC	4	1,0	GCC	0	0,0	TCC	6	1,5
ACG	0	0,0	CCG	0	0,0	GCG	0	0,0	TCG	0	0,0
ACT	10	2,6	CCT	4	1,0	GCT	0	0,0	TCT	4	1,0
AGA	4	1,0	CGA	0	0,0	GGA	2	0,5	TGA	7	1,8
AGC	3	0,8	CGC	0	0,0	GGC	3	0,8	TGC	1	0,3
AGG	6	1,5	CGG	0	0,0	GGG	6	1,5	TGG	6	1,5
AGT	5	1,3	CGT	0	0,0	GGT	6	1,5	TGT	5	1,3
ATA	21	5,4	CTA	8	2,0	GTA	10	2,6	TTA	16	4,1
ATC	8	2,0	CTC	4	1,0	GTC	1	0,3	TTC	5	1,3
ATG	9	2,3	CTG	3	0,8	GTG	2	0,5	TTG	5	1,3
ATT	20	5,1	CTT	3	0,8	GTT	3	0,8	TTT	12	3,1

Tabel 64. Frecvenţele tetramerilor, pentamerilor şi hexamerilor

Frecvenţa tetramerilor			Frecvenţa pentamerilor			Frecvenţa hexamerilor		
Tetrameri	Număr	Frecvenţa (%)	Pentameri	Număr	Frecvenţa (%)	Hexameri	Număr	Frecvenţa (%)
TATT	15	3,8	TATTA	11	2,8	ATATTA	6	1,5
ATTA	12	3,1	ATATT	6	1,5	TATTAT	4	1,0
ATAT	12	3,1	CTATT	5	1,3	TATTAA	4	1,0
CATA	9	2,3	CATAT	5	1,3	TACATA	3	0,8
TAAT	8	2,0	ATTAA	5	1,3	TAATAT	3	0,8
ATAA	7	1,8	TATTT	4	1,0	GTACAT	3	0,8
TTAT	6	1,5	TACAT	4	1,0	CTATTT	3	0,8
TTAA	6	1,5	GCATA	4	1,0	CATATT	3	0,8
TATA	6	1,5	CATAA	4	1,0	ATTAAT	3	0,8
CTAT	6	1,5	ATTAT	4	1,0	ATAAAG	3	0,8
ATTT	6	1,5	ATAAT	4	1,0	ACTATT	3	0,8
AACT	6	1,5	ACTAT	4	1,0	ACATAT	3	0,8
TACA	5	1,3	ACATA	4	1,0	AACTAT	3	0,8
TAAA	5	1,3	AATAT	4	1,0	TTAATG	2	0,5

BCU IAŞI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

GCAT	5	1,3	AACTA	4	1,0	TGTATT	2	0,5
ACTA	5	1,3	TTAAT	3	0,8	TGAACT	2	0,5
ACCA	5	1,3	TATAT	3	0,8	TATTTT	2	0,5
ACAT	5	1,3	TAGTA	3	0,8	TATTAC	2	0,5
AATA	5	1,3	TAATC	3	0,8	TAGTAC	2	0,5
TTTT	4	1,0	TAATA	3	0,8	TAATGT	2	0,5

Tabel 65. Tetrameri, pentameri şi hexameri cu frecvenţe scăzute

Tetrameri cu frecvenţă mică			Pentameri cu frecvenţă mică			Hexameri cu frecvenţă mică		
Tetrameri	Număr	Frecvenţa (%)	Pentameri	Număr	Frecvenţa (%)	Hexameri	Număr	Frecvenţa (%)
AACA	1	0,3	AAAAT	1	0,3	AAAAAA	1	0,3
ACAC	1	0,3	AAACA	1	0,3	AAAAAT	1	0,3
ACTG	1	0,3	AAAGG	1	0,3	AAAATT	1	0,3
ACTT	1	0,3	AAATA	1	0,3	AAACAT	1	0,3
AGAA	1	0,3	AACAT	1	0,3	AAAGGC	1	0,3
AGAG	1	0,3	AACTC	1	0,3	AAATAA	1	0,3
AGGA	1	0,3	AACTT	1	0,3	AAATTC	1	0,3
AGGC	1	0,3	AAGAC	1	0,3	AACATA	1	0,3
AGTT	1	0,3	AAGAG	1	0,3	AACCAG	1	0,3
ATGC	1	0,3	AAGGA	1	0,3	AACCAT	1	0,3
ATGG	1	0,3	AAGGC	1	0,3	AACTAA	1	0,3
ATTC	1	0,3	AAGGT	1	0,3	AACTCA	1	0,3
ATTG	1	0,3	AATAA	1	0,3	AACTTG	1	0,3
CAAG	1	0,3	AATTC	1	0,3	AAGACT	1	0,3
CAGT	1	0,3	ACAAA	1	0,3	AAGAGA	1	0,3
CATG	1	0,3	ACACA	1	0,3	AAGCAG	1	0,3
CATT	1	0,3	ACATT	1	0,3	AAGCAT	1	0,3
CCAC	1	0,3	ACCAC	1	0,3	AAGGAC	1	0,3
CCAG	1	0,3	ACCAG	1	0,3	AAGGCA	1	0,3
CCCC	1	0,3	ACCAT	1	0,3	AAGGTG	1	0,3

Tetramerul cu frecvenţa cea mai mare (Tabelul 64) este TATT (3,8%), iar cel cu frecvenţa redusă TTTT (1,0%). În cazul pentamerilor, cea mai mare frecvenţă o are pentamerul TATTA (2,8%), iar cea mai mică frecvenţă, o au TTAAT, TATAT, TAGTA, TAATC ŞI TAATA, toţi cu o frecvenţă de 0,8%. În ceea ce priveşte hexamerii, aceştia au frecvenţe cuprinse între 0,5% şi 1,5%.

Tetramerii, pentamerii şi hexamerii cu frecvenţă scăzută (Tabelul 65) sunt cei care se găsesc într-un singur exemplar în întreaga genă, având o frecvenţă de 0,3%.

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Cu ajutorul modulului EditSeq al DNA Star, a fost calculată temperatura de topire a ADN, după un model Davis-Botstein-Roth; în acest caz, prezintă o valoare de 75,94°C.

5.6.2.2. Modelarea structurii secundare a ARNm

Modelarea structurii ARN, s-a realizat pe baza unei energii minime de –49,0. Deoarece acest haplotip diferă de cel general doar printr-o singură bază azotată – înlocuirea citozinei cu timină în poziția 388 în urma unei tranziții, nu apar modificări majore în aspectul general al macromoleculei de ARNm. Singura diferență existentă în acest caz, între ARNm din haplotipul general pentru cele două populații şi cel al prezentei secvențe de ADN, constă în existența uracilului în locul citozinei.

De asemenea, se constată, ca şi în cazul precedent, că structura secundară a ARNm prezintă 31 de porțiuni monocatenare şi 14 regiuni bicatenare.

5.6.3. CARACTERIZAREA HAPLOTIPULUI CY05M

5.6.3.1. Frecvențele tipurilor de asocieri nucleotidice

În acest haplotip, se încadrează o singură secvență Cy05M din populația Larga-Jijia – Mărgineni, caracteristică unui individ de tip sălbatic aparținând speciei *Cyprinus carpio*. Diferența dintre acest haplotip şi cel general al celor două populații constă în substituția guaninei de către adenină, printr-un proces de tranziție, în poziția 285.

Pentru caracterizarea haplotipului, au fost calculate frecvențele dinucleotidelor (Tabelul 66), trinucleotidelor (Tabelul 67), tetramerilor, pentamerilor şi hexamerilor (Tabelul 68), precum şi tetramerii, pentamerii şi hexamerii cu frecvență scăzută (Tabelul 69).

Din tabelul 66 constatăm, referitor la procentele dinucleotidelor, că valoarea cea mai mare o are perechea AT (14,5%), iar valoarea cea mai mică perechea GC, în proporție de 1,8%; şi în acest caz sunt absente dinucleotidele de tip CG.

Referitor la trinucleotide (Tabelul 67), cea mai mare frecvență o înregistrează tripletul TAT (6,6%), iar valoarea cea mai mică, tripletele GTC şi TGC, ambele având o frecvență de 0,3%.

BCU IAŞI - UNIVERSITARIA LIBRARY

Tabel 66. Frecvența dinucleotidelor

Frecvența dinucleotidelor											
Dinucleotide	Număr	Frecvența (%)	Dinucleotide	Număr	Frecvența (%)	Dinucleotide	Număr	Frecvența (%)	Dinucleotide	Număr	Frecvența (%)
AA	47	12,0	CA	31	7,9	GA	12	3,1	TA	55	14,0
AC	25	6,4	CC	15	3,8	GC	7	1,8	TC	18	4,6
AG	17	4,3	CG	0	0,0	GG	18	4,6	TG	19	4,8
AT	57	14,5	CT	19	4,8	GT	16	4,1	TT	37	9,4

Tabel 67. Frecvența trinucleotidelor

Frecvența trinucleotidelor											
Trinucleotide	Număr	Frecvența (%)	Trinucleotide	Număr	Frecvența (%)	Trinucleotide	Număr	Frecvența (%)	Trinucleotide	Număr	Frecvența (%)
AAA	14	3,6	CAA	9	2,3	GAA	6	1,5	TAA	17	4,3
AAC	10	2,6	CAC	6	1,5	GAC	2	0,5	TAC	7	1,8
AAG	7	1,8	CAG	3	0,8	GAG	2	0,5	TAG	5	1,3
AAT	16	4,1	CAT	13	3,3	GAT	2	0,5	TAT	26	6,6
ACA	9	2,3	CCA	7	1,8	GCA	7	1,8	TCA	8	2,0
ACC	5	1,3	CCC	4	1,0	GCC	0	0,0	TCC	6	1,5
ACG	0	0,0	CCG	0	0,0	GCG	0	0,0	TCG	0	0,0
ACT	11	2,8	CCT	4	1,0	GCT	0	0,0	TCT	4	1,0
AGA	3	0,8	CGA	0	0,0	GGA	2	0,5	TGA	7	1,8
AGC	3	0,8	CGC	0	0,0	GGC	3	0,8	TGC	1	0,3
AGG	6	1,5	CGG	0	0,0	GGG	6	1,5	TGG	6	1,5
AGT	5	1,3	CGT	0	0,0	GGT	6	1,5	TGT	5	1,3
ATA	21	5,4	CTA	8	2,0	GTA	10	2,6	TTA	16	4,1
ATC	8	2,0	CTC	4	1,0	GTC	1	0,3	TTC	5	1,3
ATG	9	2,3	CTG	3	0,8	GTG	2	0,5	TTG	5	1,3
ATT	19	4,8	CTT	4	1,0	GTT	3	0,8	TTT	11	2,8

BCU BABEȘ-BOLYAI UNIVERSITY LIBRARY

Tabel 68. Frecvenţele tetramerilor, pentamerilor şi hexamerilor

Frecvenţa tetramerilor			Frecvenţa pentamerilor			Frecvenţa hexamerilor		
Tetrameri	Număr	Frecvenţa (%)	Pentameri	Număr	Frecvenţa (%)	Hexameri	Număr	Frecvenţa (%)
TATT	14	3,6	TATTA	11	2,8	ATATTA	6	1,5
ATTA	12	3,1	ATATT	6	1,5	TATTAT	4	1,0
ATAT	12	3,1	CATAT	5	1,3	TATTAA	4	1,0
CATA	9	2,3	ATTAA	5	1,3	TACATA	3	0,8
TAAT	8	2,0	TACAT	4	1,0	TAATAT	3	0,8
ATAA	7	1,8	GCATA	4	1,0	GTACAT	3	0,8
TTAT	6	1,5	CTATT	4	1,0	CATATT	3	0,8
TTAA	6	1,5	CATAA	4	1,0	ATTAAT	3	0,8
TATA	6	1,5	ATTAT	4	1,0	ATAAAG	3	0,8
AACT	6	1,5	ATAAT	4	1,0	ACTATT	3	0,8
TACA	5	1,3	ACTAT	4	1,0	ACATAT	3	0,8
TAAA	5	1,3	ACATA	4	1,0	AACTAT	3	0,8
GCAT	5	1,3	AATAT	4	1,0	TTAATG	2	0,5
CTAT	5	1,3	AACTA	4	1,0	TGTATT	2	0,5
ATTT	5	1,3	TTAAT	3	0,8	TGAACT	2	0,5
ACTA	5	1,3	TATTT	3	0,8	TATTTT	2	0,5
ACCA	5	1,3	TATAT	3	0,8	TATTAC	2	0,5
ACAT	5	1,3	TAGTA	3	0,8	TAGTAC	2	0,5
AATA	5	1,3	TAATC	3	0,8	TAATGT	2	0,5
TTTT	4	1,0	TAATA	3	0,8	TAATCC	2	0,5

Tabel 69. Tetrameri, pentameri şi hexameri cu frecvenţe scăzute

Tetrameri cu frecvenţă mică			Pentameri cu frecvenţă mică			Hexameri cu frecvenţă mică		
Tetrameri	Număr	Frecvenţa (%)	Pentameri	Număr	Frecvenţa (%)	Hexameri	Număr	Frecvenţa (%)
AACA	1	0,3	AAAAT	1	0,3	AAAAAA	1	0,3
ACAC	1	0,3	AAACA	1	0,3	AAAAAT	1	0,3
ACTG	1	0,3	AAACC	1	0,3	AAAATT	1	0,3
AGAC	1	0,3	AAAGG	1	0,3	AAACAT	1	0,3
AGGA	1	0,3	AAATA	1	0,3	AAACCA	1	0,3
AGGC	1	0,3	AACAT	1	0,3	AAAGGC	1	0,3
AGTT	1	0,3	AACTC	1	0,3	AAATAA	1	0,3
ATGC	1	0,3	AACTT	1	0,3	AAATTC	1	0,3
ATGG	1	0,3	AAGAA	1	0,3	AACATA	1	0,3

BIBLIOTECA CENTRALĂ UNIVERSITARY LIBRARY

ATTC	1	0,3	AAGAC	1	0,3	AACCAC	1	0,3
ATTG	1	0,3	AAGGA	1	0,3	AACCAG	1	0,3
CAAG	1	0,3	AAGGC	1	0,3	AACCAT	1	0,3
CAGT	1	0,3	AAGGT	1	0,3	AACTAA	1	0,3
CATG	1	0,3	AATAA	1	0,3	AACTCA	1	0,3
CATT	1	0,3	AATTC	1	0,3	AACTTG	1	0,3
CCAC	1	0,3	ACAAA	1	0,3	AAGAAA	1	0,3
CCAG	1	0,3	ACACA	1	0,3	AAGACT	1	0,3
CCCC	1	0,3	ACATT	1	0,3	AAGCAG	1	0,3
CCCT	1	0,3	ACCAC	1	0,3	AAGCAT	1	0,3
CCTA	1	0,3	ACCAG	1	0,3	AAGGAC	1	0,3

Tetramerul cu frecvenţa cea mai mare (Tabelul 68) este TATT (3,6%), iar cel cu frecvenţa redusă TTTT (1,0%). În cazul pentamerilor, cea mai mare frecvenţă o are pentamerul TATTA (2,8%), iar cea mai mică frecvenţă o au TTAAT, TATTT, TATAT, TAGTA, TAATC ŞI TAATA, toţi cu o frecvenţă de 0,8%. În ceea ce priveşte hexamerii, aceştia au frecvenţe cuprinse între 0,5% şi 1,5%.

Tetramerii, pentamerii şi hexamerii cu frecvenţă scăzută (Tabelul 69) sunt cei care se găsesc într-un singur exemplar în întreaga genă, având o frecvenţă de 0,3%.

Cu ajutorul modulului EditSeq al DNA Star, a fost calculată temperatura de topire a ADN, după un model Davis-Botstein-Roth; în acest caz, prezintă o valoare de 75,94°C.

5.6.3.2. Modelarea structurii secundare a ARNm

Modelarea structurii ARN s-a realizat pe baza unei energii minime de –49,0. Deoarece acest haplotip diferă de cel general doar printr-o singură bază azotată – înlocuirea guaninei cu adenină în poziţia 285 în urma unei tranziţii, nu apar modificări majore în aspectul general al macromoleculei de ARN. Singura diferenţă existentă în acest caz, între ARNm din haplotipul general pentru cele două populaţii şi cel al prezentei secvenţe de ADN, constă în existenţa adeninei în locul guaninei.

De asemenea, se constată, ca şi în cazul precedent, că structura secundară a ARNm prezintă 31 de porţiuni monocatenare şi 14 regiuni bicatenare.

5.6.4. CARACTERIZAREA HAPLOTIPULUI CY06MD

5.6.4.1. Frecvenţele tipurilor de asocieri nucleotidice

Haplotipul cuprinde o singură secvenţă Cy06M care diferă de haplotipul general prin apariţia următoarelor modificări ale catenei nucleotidice:

– transversie în poziţia 87 (substituţia adeninei cu citozină);

– deleţie în poziţia 217;

– tranziție în poziția 257 (substituția citozinei cu timina);
– tranziție în poziția 262 (înlocuirea citozinei cu timină);
– tranziție în poziția 263 (înlocuirea timinei cu citozină); practic, în aceste două ultime poziții, putem presupune că de fapt s-a produs o inversie care a cuprins cele două nucleotide;
– tranziție în poziția 310 (substituția citozinei cu timină);
– tranziție în poziția 340 (substituția guaninei cu adenină);
– tranziție în poziția 353 (substituția adeninei cu guanină).

Pentru caracterizarea haplotipului, au fost calculate frecvențele dinucleotidelor (Tabelul 70), trinucleotidelor (Tabelul 71), tetramerilor, pentamerilor şi hexamerilor (Tabelul 72), precum şi tetramerii, pentamerii şi hexamerii cu frecvență scăzută (Tabelul 73).

Din tabelul 70 constatăm, referitor la procentele dinucleotidelor, că valoarea cea mai mare o are perechea AT (14,3%), iar valoarea cea mai mică perechea GC, în proporție de 1,8%; şi în acest caz sunt absente dinucleotidele de tip CG.

Referitor la trinucleotide (Tabelul 71), cea mai mare frecvență o înregistrează tripletul TAT (6,6%), iar valoarea cea mai mică, tripletele GTC şi GAT, ambele având o frecvență de 0,3%.

Tabel 70. Frecvența dinucleotidelor

Frecvența dinucleotidelor											
Dinucleotide	Număr	Frecvența (%)	Dinucleotide	Număr	Frecvența (%)	Dinucleotide	Număr	Frecvența (%)	Dinucleotide	Număr	Frecvența (%)
AA	45	11,5	CA	31	7,9	GA	12	3,1	TA	54	13,8
AC	24	6,1	CC	14	3,6	GC	7	1,8	TC	19	4,8
AG	18	4,6	CG	0	0,0	GG	18	4,6	TG	19	4,8
AT	56	14,3	CT	19	4,8	GT	17	4,3	TT	39	9,9

BCU IAŞI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Tabel 71. Frecvența trinucleotidelor

Frecvența trinucleotidelor											
Trinucleotide	Număr	Frecvența (%)	Trinucleotide	Număr	Frecvența (%)	Trinucleotide	Număr	Frecvența (%)	Trinucleotide	Număr	Frecvența (%)
AAA	12	3,1	CAA	10	2,6	GAA	5	1,3	TAA	17	4,3
AAC	9	2,3	CAC	6	1,5	GAC	3	0,8	TAC	6	1,5
AAG	7	1,8	CAG	3	0,8	GAG	3	0,8	TAG	5	1,3
AAT	17	4,3	CAT	12	3,1	GAT	1	0,3	TAT	26	6,6
ACA	8	2,0	CCA	7	1,8	GCA	7	1,8	TCA	9	2,3
ACC	5	1,3	CCC	3	0,8	GCC	0	0,0	TCC	6	1,5
ACG	0	0,0	CCG	0	0,0	GCG	0	0,0	TCG	0	0,0
ACT	11	2,8	CCT	4	1,0	GCT	0	0,0	TCT	4	1,0
AGA	4	1,0	CGA	0	0,0	GGA	2	0,5	TGA	6	1,5
AGC	3	0,8	CGC	0	0,0	GGC	2	0,5	TGC	2	0,5
AGG	6	1,5	CGG	0	0,0	GGG	6	1,5	TGG	6	1,5
AGT	5	1,3	CGT	0	0,0	GGT	7	1,8	TGT	5	1,3
ATA	20	5,1	CTA	8	2,0	GTA	11	2,8	TTA	15	3,8
ATC	7	1,8	CTC	4	1,0	GTC	1	0,3	TTC	7	1,8
ATG	8	2,0	CTG	3	0,8	GTG	2	0,5	TTG	6	1,5
ATT	21	5,4	CTT	4	1,0	GTT	3	0,8	TTT	11	2,8

Tabel 72. Frecvențele tetramerilor, pentamerilor și hexamerilor

Frecvența tetramerilor			Frecvența pentamerilor			Frecvența hexamerilor		
Tetrameri	Număr	Frecvența (%)	Pentameri	Număr	Frecvența (%)	Hexameri	Număr	Frecvența (%)
TATT	14	3,6	TATTA	11	2,8	ATATTA	6	1,5
ATTA	12	3,1	ATATT	6	1,5	TATTAT	4	1,0
ATAT	10	2,6	ATTAA	5	1,3	TATTAA	4	1,0
TAAT	9	2,3	ATAAT	5	1,3	TAATAT	3	0,8
ATAA	8	2,1	TACAT	4	1,0	GTACAT	3	0,8
CATA	7	1,8	CTATT	4	1,0	CATATT	3	0,8
TTAT	6	1,5	CATAA	4	1,0	ATTAAT	3	0,8
TTAA	6	1,5	ATTAT	4	1,0	ATAAAG	3	0,8
TATA	6	1,5	ACTAT	4	1,0	ACTATT	3	0,8
CTAT	6	1,5	AATAT	4	1,0	AACTAT	3	0,8
AATA	6	1,5	AACTA	4	1,0	TTAATG	2	0,5
AACT	6	1,5	TTAAT	3	0,8	TGTATT	2	0,5
ATTT	5	1,3	TATTT	3	0,8	TGAACT	2	0,5

BCU IASI CENTRALA CARTII LIBRARY

ACTA	5	1,3	TATAT	3	0,8	TATTTT	2	0,5
ACCA	5	1,3	TAGTA	3	0,8	TATTAC	2	0,5
ACAT	5	1,3	TAATA	3	0,8	TAGTAC	2	0,5
AATT	5	1,3	TAAAG	3	0,8	TACATA	2	0,5
TTTT	4	1,0	GTACA	3	0,8	TAATGT	2	0,5
TGAA	4	1,0	GCATA	3	0,8	TAAAGC	2	0,5
TCAA	4	1,0	CATAT	3	0,8	GTATTA	2	0,5

Tabel 73. Tetrameri, pentameri şi hexameri cu frecvenţe scăzute

Tetrameri cu frecvenţă mică			Pentameri cu frecvenţă mică			Hexameri cu frecvenţă mică		
Tetrameri	Număr	Frecvenţa (%)	Pentameri	Număr	Frecvenţa (%)	Hexameri	Număr	Frecvenţa (%)
AACA	1	0,3	AAAAA	1	0,3	AAAAAT	1	0,3
ACTG	1	0,3	AAAAT	1	0,3	AAAATT	1	0,3
AGAA	1	0,3	AAACA	1	0,3	AAACAT	1	0,3
AGAG	1	0,3	AAAGG	1	0,3	AAAGGT	1	0,3
AGGA	1	0,3	AAATA	1	0,3	AAATAA	1	0,3
AGTT	1	0,3	AACAT	1	0,3	AAATTC	1	0,3
ATCC	1	0,3	AACTC	1	0,3	AACATA	1	0,3
ATGC	1	0,3	AACTT	1	0,3	AACCAG	1	0,3
ATGG	1	0,3	AAGAC	1	0,3	AACCAT	1	0,3
ATTG	1	0,3	AAGAG	1	0,3	AACTAA	1	0,3
CAAG	1	0,3	AAGGA	1	0,3	AACTCA	1	0,3
CAGT	1	0,3	AATCC	1	0,3	AACTTG	1	0,3
CATG	1	0,3	AATGA	1	0,3	AAGACT	1	0,3
CCAC	1	0,3	AATTG	1	0,3	AAGAGA	1	0,3
CCAG	1	0,3	ACAAA	1	0,3	AAGCAG	1	0,3
CCCA	1	0,3	ACATC	1	0,3	AAGCAT	1	0,3
CCCC	1	0,3	ACATT	1	0,3	AAGGAC	1	0,3
CCCT	1	0,3	ACCAC	1	0,3	AAGGTA	1	0,3
CCTA	1	0,3	ACCAG	1	0,3	AAGGTG	1	0,3
CCTC	1	0,3	ACCAT	1	0,3	AATATA	1	0,3

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Tetramerul cu frecvenţa cea mai mare (Tabelul 72) este TATT (3,6%), iar cei cu frecvenţa cea mai mică, TTTT, TGAA, TCAA (1,0%). În cazul pentamerilor, cea mai mare frecvenţă o are pentamerul TATTA (2,8%), iar cea mai mică frecvenţă o au TTAAT, TATTT, TATAT, TAGTA, TAATA, TAAAG, GTACA, GCATA şi CATAT, toţi cu o frecvenţă de 0,8%. În ceea ce priveşte hexamerii, aceştia au frecvenţe cuprinse între 0,5% şi 1,5%.

Tetramerii, pentamerii şi hexamerii cu frecvenţă scăzută (Tabelul 73), sunt cei care se găsesc într-un singur exemplar în întreaga genă, având o frecvenţă de 0,3%.

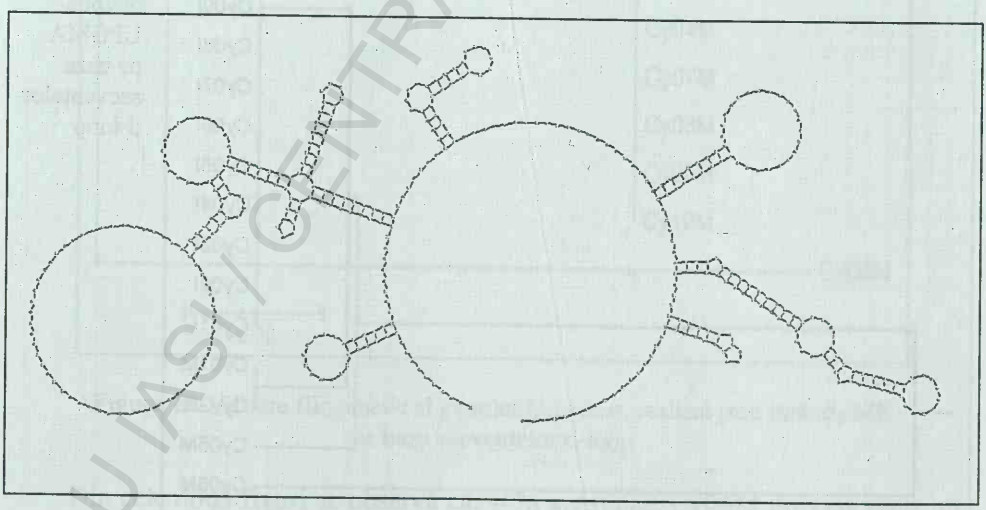
Cu ajutorul modulului EditSeq al DNA Star, a fost calculată temperatura de topire a ADN, după un model Davis-Botstein-Roth; în acest caz, prezintă o valoare de 76,04°C.

5.6.4.2. Modelarea structurii secundare a ARNm

Modelarea structurii ARN s-a realizat pe baza unei energii minime de –48,17, utilizând modulul GeneQuest al programului DNA Star.

Structura secundară a macromoleculei de ARNm este prezentată în figura 80, iar detaliile acestei imagini sunt prezentate în Anexa 7.

Figura 80. Modelarea structurii secundare a ARNm pentru haplotipul Cy06M al regiunii de control mitocondrial, la specia *Cyprinus carpio*



BCU IAŞI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Din figura 80 şi Anexa 7, se constată existența a 30 regiuni monocatenare şi a 15 regiuni bicatenare.

5.6.5. RELAȚII FILOGENETICE ÎN CADRUL GENULUI CYPRINUS, *BAZATE PE DIFERENȚE ALE SECVENȚELOR D-LOOP*

Ca şi în cazul citocromului b, au fost utilizate metode care se bazează pe distanțe şi rata de substituție, dar care implică şi mutații de genul tranzițiilor şi transversiilor. Astfel, şi în acest caz au fost utilizate UPGMA (Figura 81) pe baza unui model Tamura-Nei, metoda evoluției minime (ME), după un algoritm Neighbor-Joining (Figura 82) şi Maximum-Parsimony (Figura 83).

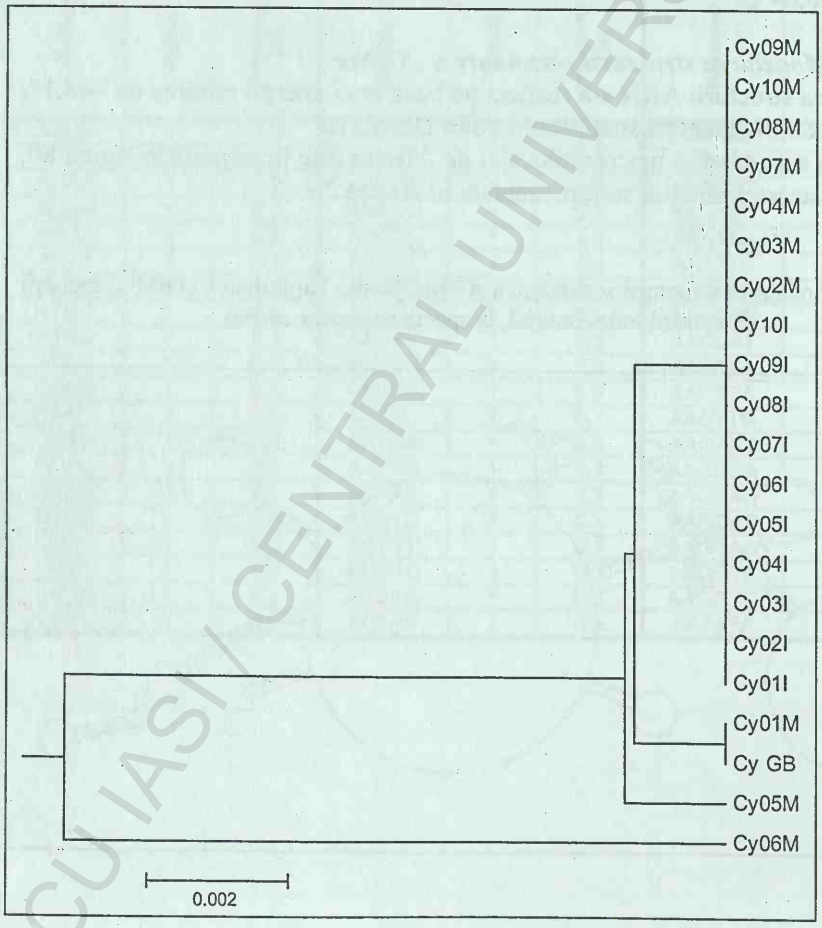


Figura 81. Arbore filogenetic rectangular al genului *Cyprinus*, realizat prin metoda UPGMA pe baza secvențelor d-loop

BCU IAŞI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

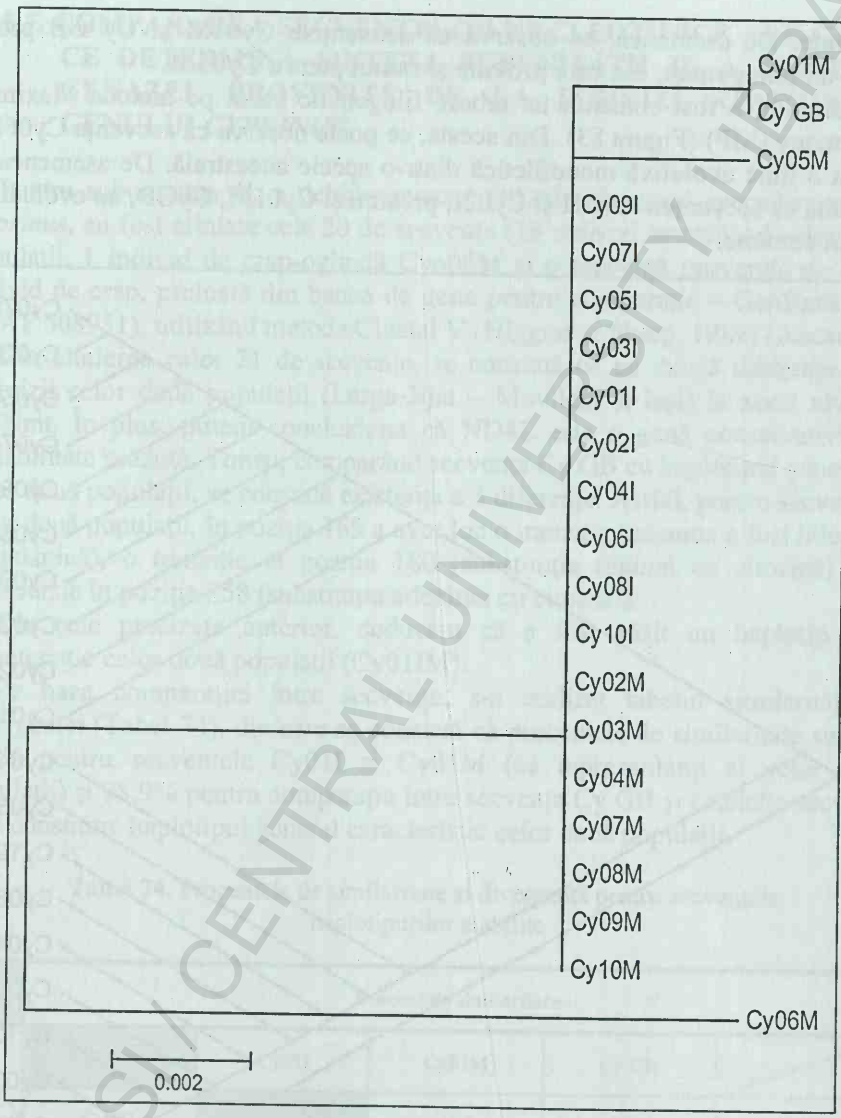


Figura 82. Arbore filogenetic al genului *Cyprinus*, realizat prin metoda ME pe baza secvențelor d-loop

Din cele două figuri se observă că, și în acest caz, Cy06M provine dintr-un nod comun ancestral, din care provin și ramurile comune pentru celelalte

BCU IAȘI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

secvenţe. De asemenea, se observă că secvenţele Cy01M şi Cy GB provin dintr-un ram comun, din care provine şi ramul pentru Cy05M.

Ulterior, a fost construit un arbore filogenetic bazat pe metoda Maximum Parsimony (MP) (Figura 83). Din acesta, se poate observa că secvenţa Cy06M a urmat o linie evolutivă monofiletică dintr-o specie ancestrală. De asemenea, se constată că secvenţele Cy01I şi Cy02I, precum şi Cy01M, CyGB, au evoluat din noduri comune.

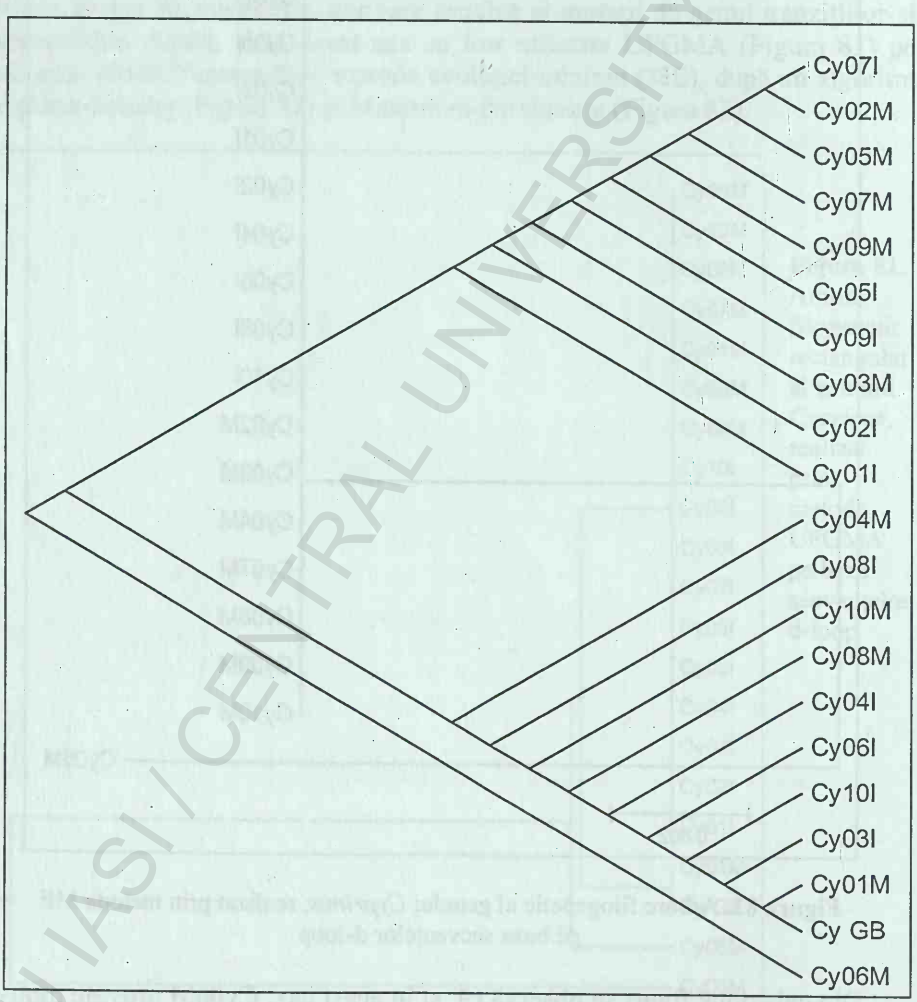


Figura 83. Arbore filogenetic al genului *Cyprinus*, realizat prin metoda MP pe baza secvenţelor d-loop

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

5.7. COMPARAREA SECVENŢELOR NUCLEOTIDICE ALE GENEI CE DETERMINĂ SINTEZA SUBUNITĂŢII 4L A DEHIDROGENAZEI, PROVENITE DE LA INDIVIZI APARŢINÂND GENULUI *CYPRINUS*

Pentru subunitatea 4L a dehidrogenazei (ND4L), în cazul speciilor genului *Cyprinus*, au fost aliniate cele 20 de secvenţe (19 indivizi aparţinând celor două populaţii, 1 individ de crap-oglindă Cyo06M şi o secvenţă provenită de la un individ de crap, preluată din banca de gene pentru comparaţie – GenBank Ref. nr. AF 508931), utilizând metoda Clustal V (Higgins şi Sharp, 1989) (Anexa 8).

Din alinierea celor 21 de secvenţe, se constată că nu există diferenţe între indivizii celor două populaţii (Larga-Jijia – Movileni şi Iaşi) la acest nivel al ADNmt. În plus, putem concluziona că ND4L este o genă conservativă, cu variabilitate scăzută. Totuşi, comparând secvenţa Cy GB cu haplotipul general al celor două populaţii, se constată existenţa a 3 diferenţe. Astfel, pentru secvenţele celor două populaţii, în poziţia 165 a avut loc o tranziţie (adenina a fost înlocuită cu guanină), o tranziţie în poziţia 180 (substituţia timinei cu citozină) şi o transversie în poziţia 258 (substituţia adeninei cu citozină).

Din cele precizate anterior, deducem că a fost găsit un haplotip nou, caracteristic celor două populaţii (Cy01IM).

Pe baza comparaţiei între secvenţe, s-a realizat tabelul similarităţii şi divergenţei (Tabel 74), din care se constată că procentele de similaritate sunt de 100% pentru secvenţele Cy01I şi Cy01M (ca reprezentanţi ai celor două populaţii) şi 98,9% pentru comparaţia între secvenţa Cy GB şi celelalte secvenţe care constituie haplotipul general caracteristic celor două populaţii.

Tabel 74. Procentele de similaritate şi divergenţă pentru secvenţele haplotipurilor stabilite

	Procent de similaritate				
Procent de divergenţă		Cy01I	Cy01M	Cy GB	
	Cy01I		100	98,9	Cy01I
	Cy01M	0,0		98,9	Cy01M
	Cy GB	1,2	1,2		Cy GB
		Cy01I	Cy01M	Cy GB	

În plus, pentru a stabili o mai clară diferențiere între toate noile haplotipuri, au fost analizate numărul şi procentele în care se găsesc bazele azotate în fiecare dintre acestea (Tabel 75).

Tabel 75. Procentul bazelor azotate, în cadrul haplotipurilor stabilite

Baze azotate		Specii analizate		
		Cy01I	Cy01M	Cy GB
A	Nr.	63	63	65
	%	24,14	24,14	24,90
G	Nr.	44	44	43
	%	16,86	16,86	16,48
T	Nr.	74	74	75
	%	28,35	28,35	28,74
C	Nr.	80	80	78
	%	30,65	30,65	29,89
A+T	Nr.	137	137	140
	%	52,49	52,49	53,64
C+G	Nr.	124	124	121
	%	47,51	47,51	46,36

Din tabelul 75 şi figurile 84 şi 85, după cum a fost precizat şi anterior, se observă că diferențe majore se constată pentru secvența Cy GB, care prezintă valori diferite pentru toate bazele azotate, comparativ cu celelalte haplotipuri.

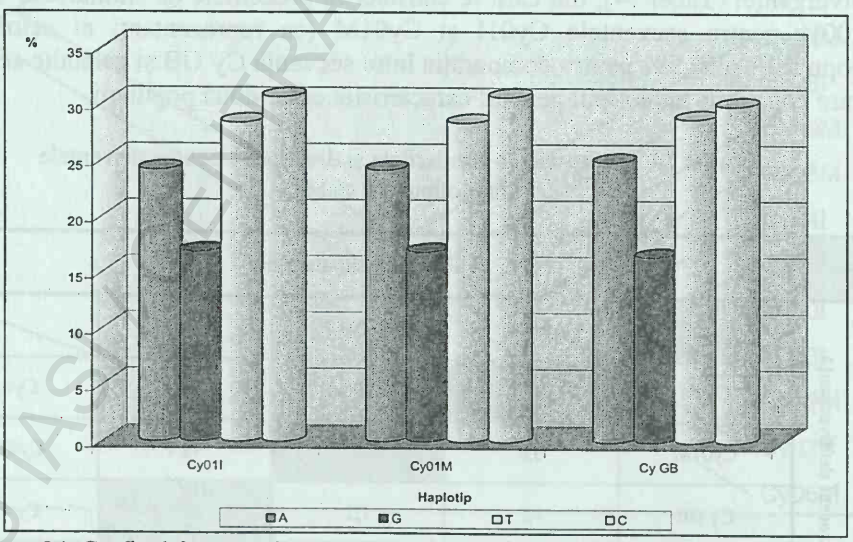


Figura 84. Graficul frecvenței bazelor azotate în cadrul haplotipurilor caracterizate

BCU IAŞI CENTRALA UNIVERSITARĂ LIBRARY

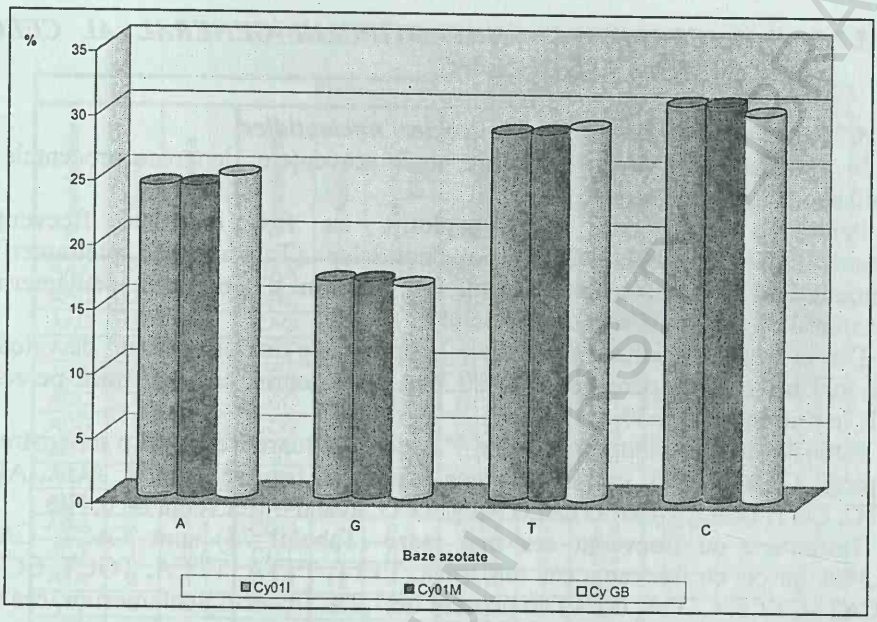


Figura 85. Graficul comparativ al frecvenţei bazelor azotate, pentru haplotipurile analizate

Referitor la cantitatea de adenină (A), aceasta este egală pentru Cy01I şi Cy01M, fiind în proporţie de 24,14%, iar pentru Cy GB, în proporţie de 24,90%. Cantitatea de guanină este cuprinsă între 16,86% (Cy01I, Cy01M) şi 16,48% pentru Cy GB. De asemenea, se constată diferenţe şi pentru celelalte baze azotate: cantitatea de timină are valori de 28,35% pentru haplotipul general şi 28,74% pentru Cy GB, iar citozina, 30,65% pentru Cy01I (ca reprezentant al haplotipului general caracteristic celor două populaţii) şi 29,89% pentru haplotipul Cy GB.

Procentul de baze complementare este de 52,49% în cazul A+T pentru Cy01I şi 53,64% pentru Cy GB. Procentul de G+C este de 47,51% (Cy01I, Cy01M) şi de 46,36% pentru Cy GB.

BCU IAŞI - CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

5.7.1. CARACTERIZAREA HAPLOTIPULUI GENERAL AL CELOR DOUĂ POPULAŢII (CY01IM)

5.7.1.1. Frecvenţele tipurilor de asocieri nucleotidice

În acest haplotip au fost încadrate toate secvenţele, deoarece procentele de similaritate sunt de 100%.

Pentru a caracteriza acest haplotip, au fost calculate frecvenţele dinucleotidelor (Tabelul 76), trinucleotidelor (Tabelul 77), tetramerilor, pentamerilor şi hexamerilor (Tabelul 78), precum şi tetramerii, pentamerii şi hexamerii cu frecvenţă scăzută (Tabelul 79).

Din tabelul 76 constatăm, referitor la procentele dinucleotidelor, că valoarea cea mai mare o are perechea CT (10.3%), iar valoarea cea mai mică perechea GT, în proporţie de 2,3%.

Referitor la trinucleotide (Tabelul 77), cea mai mare frecvenţă o înregistrează tripletul CTA (4,6%), iar valoarea cea mai mică, tripletele ACG, AGA, AGT, ATC, CGT, GAG, GCG, GTA, GTG şi TCG, având o frecvenţă de 0,4%.

Tetramerii cu frecvenţa cea mai mare (Tabelul 78) sunt TACT, CATT (2,3%), iar cei cu frecvenţa cea mai mică, TTTT, TTTA, TTCA, TGCT, GCTA, GCAT, CTTT, CTCA, CTAT în procent de 1,2%. În cazul pentamerilor, cea mai mare frecvenţă o are pentamerul CTACT (1,5%). În ceea ce priveşte hexamerii, aceştia au frecvenţe cuprinse între 1,2% (AGCATT) şi 0,4%.

Tetramerii, pentamerii şi hexamerii cu frecvenţă scăzută sunt cei care se găsesc într-un singur exemplar în întreaga genă, având o frecvenţă de 0,4% (Tabelul 79).

Cu ajutorul modulului EditSeq al DNA Star, a fost calculată temperatura de topire a ADN, după un model Davis-Botstein-Roth; în acest caz, prezintă o valoare de 82,46°C.

Tabel 76. Frecvenţa dinucleotidelor

Frecvenţa dinucleotidelor											
Dinucleotide	Număr	Frecvenţa (%)	Dinucleotide	Număr	Frecvenţa (%)	Dinucleotide	Număr	Frecvenţa (%)	Dinucleotide	Număr	Frecvenţa (%)
AA	9	3,4	CA	23	8,8	GA	9	3,4	TA	22	8,4
AC	23	8,8	CC	21	8,0	GC	21	8,0	TC	15	5,7
AG	15	5,7	CG	9	3,4	GG	9	3,4	TG	12	4,6
AT	16	6,1	CT	27	10,3	GT	6	2,3	TT	25	9,5

BCU IAŞI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Tabel 77. Frecvența trinucleotidelor

Frecvența trinucleotidelor											
Trinucleotide	Număr	Frecvența (%)	Trinucleotide	Număr	Frecvența (%)	Trinucleotide	Număr	Frecvența (%)	Trinucleotide	Număr	Frecvența (%)
AAA	0	0,0	CAA	2	0,8	GAA	5	1,9	TAA	2	0,8
AAC	2	0,8	CAC	10	3,8	GAC	2	0,8	TAC	9	3,4
AAG	2	0,8	CAG	4	1,5	GAG	1	0,4	TAG	8	3,1
AAT	5	1,9	CAT	7	2,7	GAT	0	0,0	TAT	3	1,1
ACA	5	1,9	CCA	4	1,5	GCA	8	3,1	TCA	6	2,3
ACC	7	2,7	CCC	7	2,7	GCC	3	1,1	TCC	4	1,5
ACG	1	0,4	CCG	6	2,3	GCG	1	0,4	TCG	1	0,4
ACT	10	3,8	CCT	4	1,5	GCT	9	3,4	TCT	4	1,5
AGA	1	0,4	CGA	2	0,8	GGA	2	0,8	TGA	4	1,5
AGC	10	3,8	CGC	4	1,5	GGC	3	1,1	TGC	4	1,5
AGG	3	1,1	CGG	2	0,8	GGG	2	0,8	TGG	2	0,8
AGT	1	0,4	CGT	1	0,4	GGT	2	0,8	TGT	2	0,8
ATA	3	1,1	CTA	12	4,6	GTA	1	0,4	TTA	6	2,3
ATC	1	0,4	CTC	6	2,3	GTC	2	0,8	TTC	6	2,3
ATG	4	1,5	CTG	3	1,1	GTG	1	0,4	TTG	4	1,5
ATT	8	3,1	CTT	6	2,3	GTT	2	0,8	TTT	9	3,4

Tabel 78. Frecvențele tetramerilor, pentamerilor și hexamerilor

Frecvența tetramerilor			Frecvența pentamerilor			Frecvența hexamerilor		
Tetrameri	Număr	Frecvența (%)	Pentameri	Număr	Frecvența (%)	Hexameri	Număr	Frecvența (%)
TACT	6	2,3	CTACT	4	1,5	AGCATT	3	1,2
CATT	6	2,3	TTTAG	3	1,2	TTTTAG	2	0,8
TTAG	5	1,9	TAGCA	3	1,2	TTCATT	2	0,80,8
TAGC	5	1,9	TACTA	3	1,2	TAGCAC	2	0,8
GCAC	5	1,9	GCATT	3	1,2	TACTAC	2	0,8
CTAC	5	1,9	GCACT	3	1,2	GCTTAG	2	0,8
CACC	5	1,9	CTAGC	3	1,2	GCATTC	2	0,8
AGCA	5	1,9	CACCG	3	1,2	GCACCG	2	0,8
ACTA	5	1,9	AGCAT	3	1,2	CTAGCA	2	0,8
GCTT	4	1,5	TTTTA	2	0,8	CTACTA	2	0,8
ACCG	4	1,5	TTCAT	2	0,8	CCCTAT	2	0,8
TTTT	3	1,2	TTAGC	2	0,8	CACCGA	2	0,8
TTTA	3	1,2	TGCTT	2	0,8	ATTCAT	2	0,8

BIBLIOTECA CENTRALĂ UNIVERSITARĂ LIBRARY

TTCA	3	1,2	TCCAC	2	0,8	ACTAGC	2	0,8
TGCT	3	1,2	TCATT	2	0,8	ACTACT	2	0,8
GCTA	3	1,2	TCAGC	2	0,8	TTTTCT	1	0,4
GCAT	3	1,2	TACTG	2	0,8	TTTGAA	1	0,4
CTTT	3	1,2	GCTTA	2	0,8	TTTCTG	1	0,4
CTCA	3	1,2	GCTAC	2	0,8	TTTCAG	1	0,4
CTAT	3	1,2	GCACC	2	0,8	TTTAGT	1	0,4

Tabel 79. Tetrameri, pentameri şi hexameri cu frecvenţe scăzute

Tetrameri cu frecvenţă mică			Pentameri cu frecvenţă mică			Hexameri cu frecvenţă mică		
Tetrameri	Număr	Frecvenţa (%)	Pentameri	Număr	Frecvenţa (%)	Hexameri	Număr	Frecvenţa (%)
AACA	1	0,4	AACAG	1	0,4	AACAGC	1	0,4
AACC	1	0,4	AACCC	1	0,4	AACCCA	1	0,4
AAGC	1	0,4	AAGCT	1	0,4	AAGCTA	1	0,4
AAGG	1	0,4	AAGGA	1	0,4	AAGGAA	1	0,4
AATC	1	0,4	AATAA	1	0,4	AATAAT	1	0,4
AATG	1	0,4	AATAC	1	0,4	AATACT	1	0,4
AATT	1	0,4	AATCC	1	0,4	AATCCA	1	0,4
ACAA	1	0,4	AATGG	1	0,4	AATGGG	1	0,4
ACAC	1	0,4	AATTT	1	0,4	AATTTG	1	0,4
ACAT	1	0,4	ACAAT	1	0,4	ACAATT	1	0,4
ACCT	1	0,4	ACACC	1	0,4	ACACCC	1	0,4
ACGG	1	0,4	ACAGC	1	0,4	ACAGCC	1	0,4
ACTT	1	0,4	ACAGG	1	0,4	ACAGGG	1	0,4
AGAA	1	0,4	ACATT	1	0,4	ACATTT	1	0,4
AGGA	1	0,4	ACCCA	1	0,4	ACCCAC	1	0,4
AGGG	1	0,4	ACCCG	1	0,4	ACCCGT	1	0,4
AGGT	1	0,4	ACCGC	1	0,4	ACCGAA	1	0,4
AGTT	1	0,4	ACCGG	1	0,4	ACCGCT	1	0,4
ATAA	1	0,4	ACCTA	1	0,4	ACCGGC	1	0,4
ATCC	1	0,4	ACGGC	1	0,4	ACCTAC	1	0,4

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

5.7.1.2. Modelarea structurii secundare a ARNm

Utilizând modulul GeneQuest al programului DNA Star, a fost modelată structura ARN (Figura 86), pe baza unei energii minime de –31,17, detaliile acestei figuri fiind prezentate în Anexa 9.

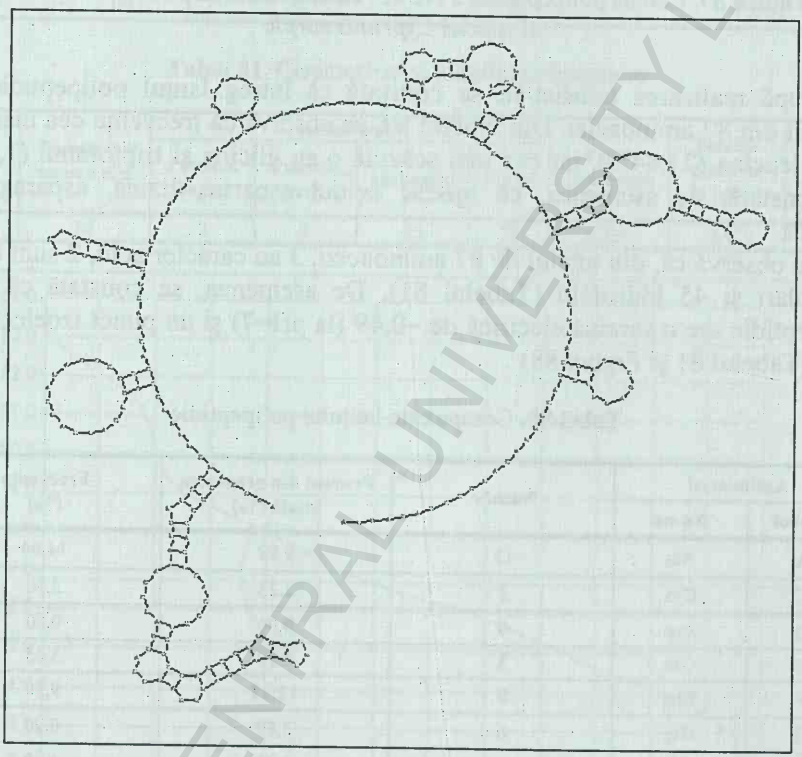


Figura 86. Modelarea structurii secundare a ARNm pentru haplotipul Cy01IM al dehidrogenazei subunitatea 4L, la specia *Cyprinus carpio*

Din figura 86 şi Anexa 9, putem constata existenţa a 26 de porţiuni monocatenare şi 15 regiuni bicatenare.

5.7.1.3. Translaţia şi caracterizarea catenei polipeptidice

Translaţia s-a realizat pe baza codului genetic mitocondrial pentru vertebrate, utilizând modulul EditSeq din cadrul programului DNA Star.

Catena polipeptidică obţinută este prezentată în figura 87.

BCU CLUJ / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

```
MTPVHFSFSS AFILGLMGLA FHRTHLLSAL LCLEGMMLSL
FIALALWALQ FESTGFSTAP MLLLAFSACE ASTGLALLVA ARTHGT
```

Figura 87. Catena polipeptidică a ND4L, caracteristică haplotipului Cy01IM al speciei *Cyprinus carpio*

După realizarea translației, se constată că întreg lanțul polipeptidic este alcătuit din 87 aminoacizi. Din tabelul 80, se observă că frecvența cea mai mare o are leucina (21,84%), iar cea mai scăzută o au glicina şi triptofanul (1,15%). Se constată, de asemenea, că lipsesc acidul aspartic, lizina, asparagina şi tirozina.

Se observă că, din totalul de 87 aminoacizi, 3 au caracter acid, 2 sunt bazici, 20 polari şi 45 hidrofobi (Tabelul 81). De asemenea, se constată că lanțul polipeptidic are o sarcină electrică de –0,49 (la pH=7) şi un punct izoelectric de 6,73 (Tabelul 81 şi Figura 88).

Tabel 80. Compoziția lanțului polipeptidic

Aminoacizi		Număr	Procent din greutatea totală (%)	Frecvența (%)
Simbol	Nume			
A	Ala	13	9,99	14,94
C	Cys	2	2,23	2,30
D	Asp	0	0,00	0,00
E	Glu	3	4,19	3,45
F	Phe	8	12,73	9,20
G	Gly	6	3,70	6,90
H	His	4	5,93	4,60
I	Ile	2	2,45	2,30
K	Lys	0	0,00	0,00
L	Leu	19	23,25	21,84
M	Met	5	7,09	5,75
N	Asn	0	0,00	0,00
P	Pro	2	2,10	2,30
Q	Gln	1	1,39	1,15
R	Arg	2	3,38	2,30
S	Ser	9	8,48	10,34
T	Thr	8	8,75	9,20
V	Val	2	2,14	2,30

BCU MIHAI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

W	Trp	1	2,01	1,15
Y	Tyr	0	0,00	0,00
B	Asx	0	0,00	0,00
Z	Glx	0	0,00	0,00
.	Ter	0	0,00	0,00

Tabel 81. Caracterizarea lanţului polipeptidic

Greutate moleculară (Daltoni)	Număr de aminoacizi	Aminoacizi				Punct izoelectric	Sarcina electrică la pH=7	Concentraţia la o extincţie =1 şi λ=280nm
		Puternic bazici	Puternic acizi	Hidrofobi	Polari			
9247,07	87	2	3	45	20	6,736	-0,479	1,56

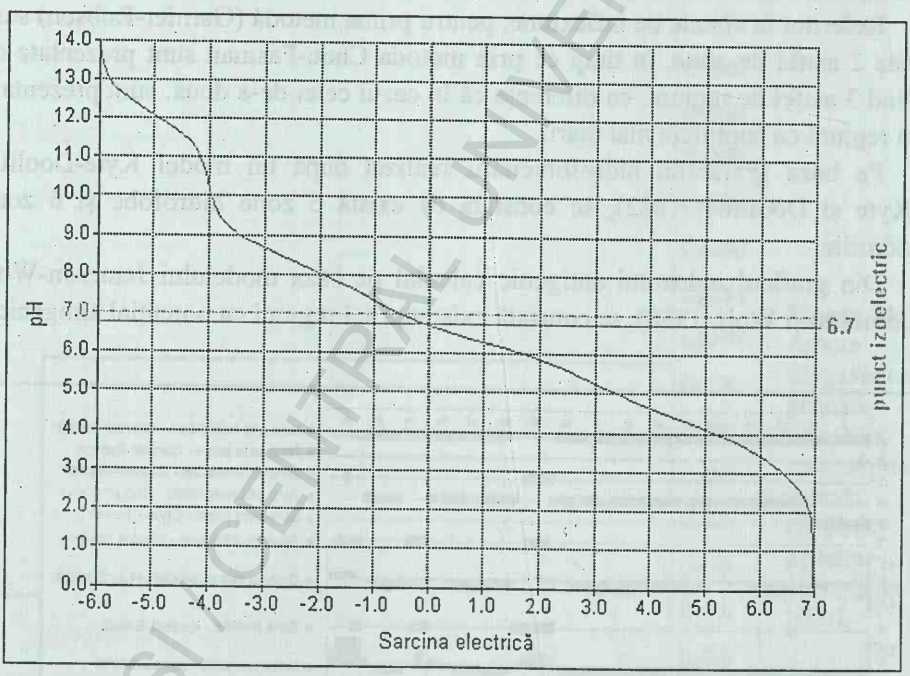


Figura 88. Curba de titrare pentru lanţul polipeptidic al ND4L, haplotip Cy01IM, al speciei *Cyprinus carpio*

Ulterior, a fost realizată o analiză a structurii proteinei (Figura 89); astfel, au fost determinate zonele alfa helicoidale, beta pliate şi de inflexiune, prin două metode Garnier-Robson (Garnier *et al.*, 1978) şi Chou-Fasman (Chou şi Fasman,

BCU IAŞI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

1978); reprezentarea grafică a zonelor hidrofobe (Kyte şi Doolittle, 1982), zonele de flexie (Karplus şi Schultz, 1985), indexul antigenic (Jameson şi Wolf, 1988) şi graficul probabil al suprafeţei (Emini *et al.*, 1985).

Din analiza structurii lanţului polipeptidic, se poate observa că, referitor la regiunile alfa helicoidale, nu există diferenţe majore între cele două metode Garnier-Robson şi Chou-Fasman. Astfel, în cazul ambelor metode, se observă că există 3 regiuni alfa helicoidale, existând o suprapunere parţială a suprafeţelor comparativ între cele două metode. De asemenea, pentru regiunile beta pliate, se observă că, pentru ambele metode, se constată existenţa unei singure regiuni beta pliate situate la începutul catenei polipeptidice, cu deosebirea dată de diferenţele de mărime dintre suprafeţele acestor regiuni determinate prin cele două metode.

Referitor la zonele de inflexiune, pentru prima metodă (Garnier-Robson) sunt date 2 astfel de zone, în timp ce prin metoda Chou-Fasman sunt prezentate ca fiind 3 astfel de regiuni, cu diferenţa că în cazul celei de-a doua, sunt prezentate ca regiuni cu suprafeţe mai mari.

Pe baza graficului hidrofobicităţii realizat după un model Kyte-Doolitle (Kyte şi Doolittle, 1982), se constată că există 6 zone hidrofobe şi 6 zone hidrofile.

Din graficul indexului antigenic calculat pe baza modelului Jameson-Wolf (Jameson şi Wolf, 1988), se constată existenţa a 3 regiuni cu potenţial antigenic.

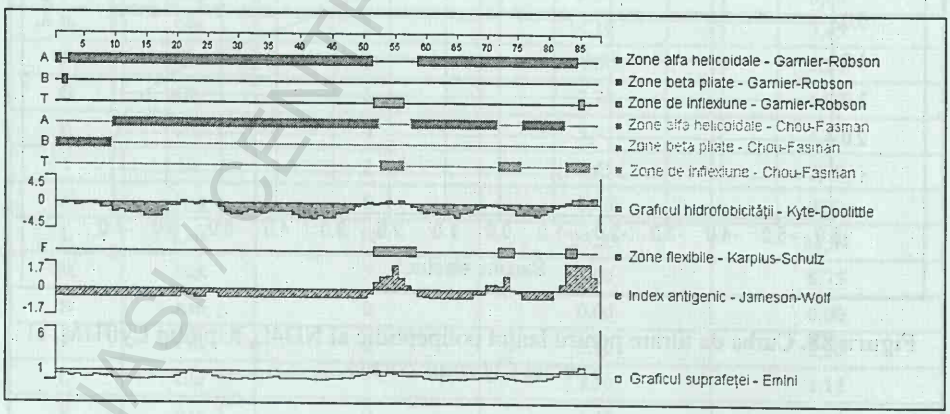


Figura 89. Analiza structurii lanţului polipeptidic

BCU IAŞI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

5.7.2. RELAȚII FILOGENETICE ÎN CADRUL GENULUI CYPRINUS, BAZATE PE DIFERENȚE ALE SECVENȚELOR ND4L

În acest caz, arborii filogenetici au fost realizați, utilizând aceleași metode UPGMA pe baza modelului Tamura-Nei (Figura 90) și Minimum Evolution pe baza unui algoritm Neighbor-Joining (Figura 91 și 92). Maximum Parsimony nu poate fi folosită în acest caz, deoarece nu există situri informative pentru această metodă (situri conservative care să intervină cu o frecvență de minim 2).

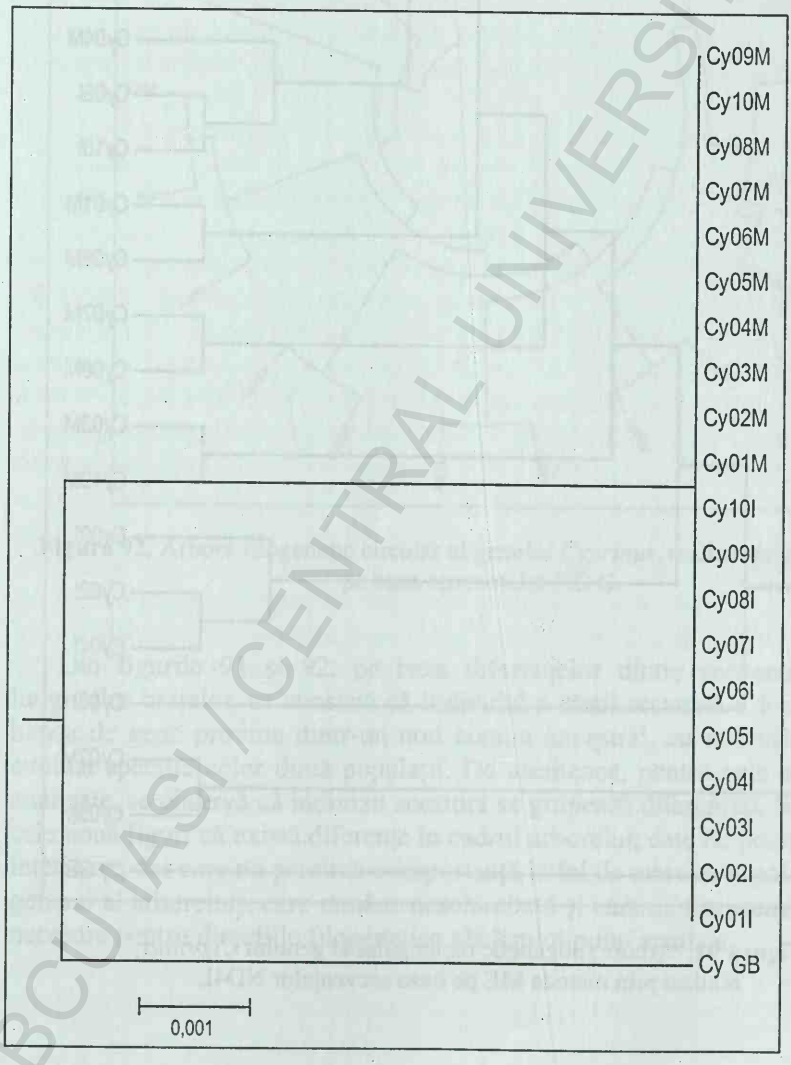


Figura 90. Arbore filogenetic al genului *Cyprinus*, realizat prin metoda UPGMA pe baza secvențelor ND4L

BCU IAȘI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

B.C.U. „M. EMINESCU" IAȘI

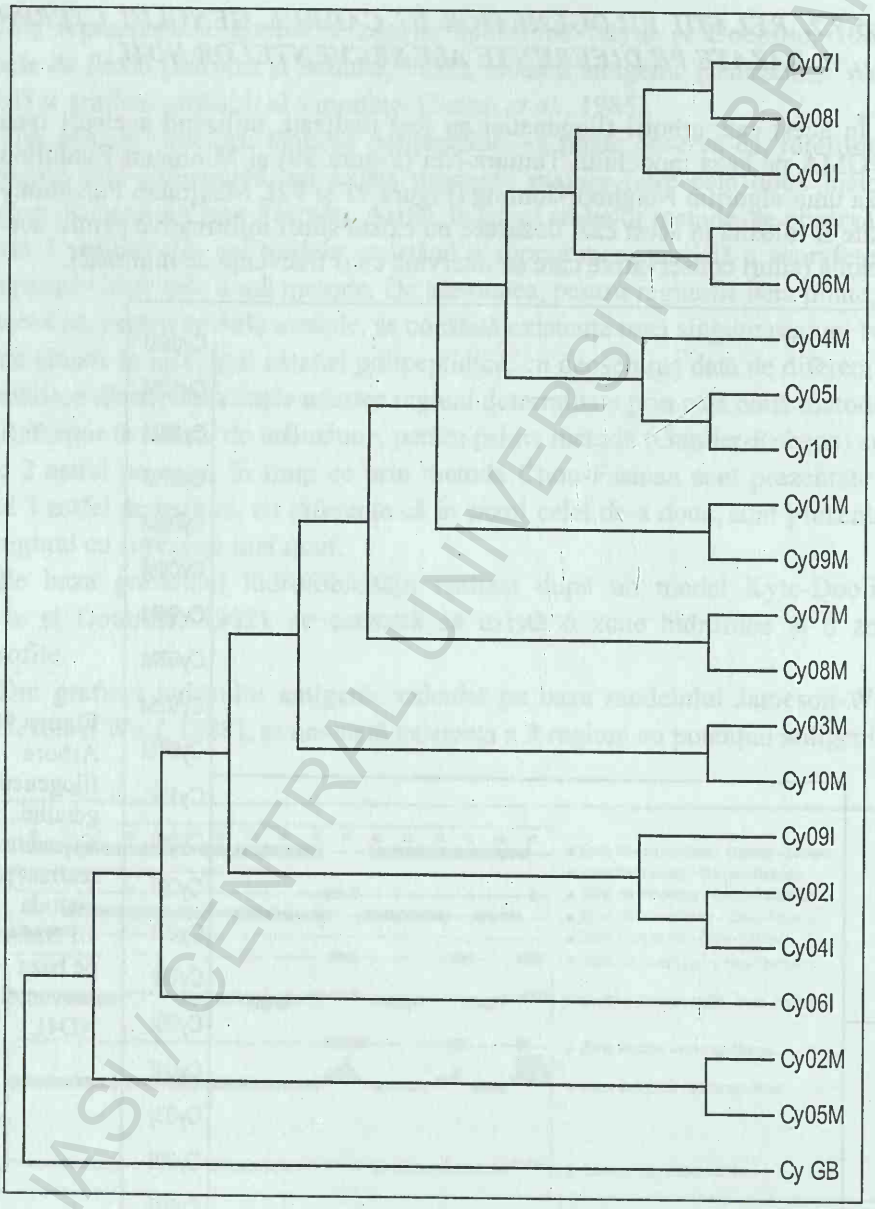


Figura 91. Arbore filogenetic rectangular al genului *Cyprinus*, realizat prin metoda ME pe baza secvenţelor ND4L

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

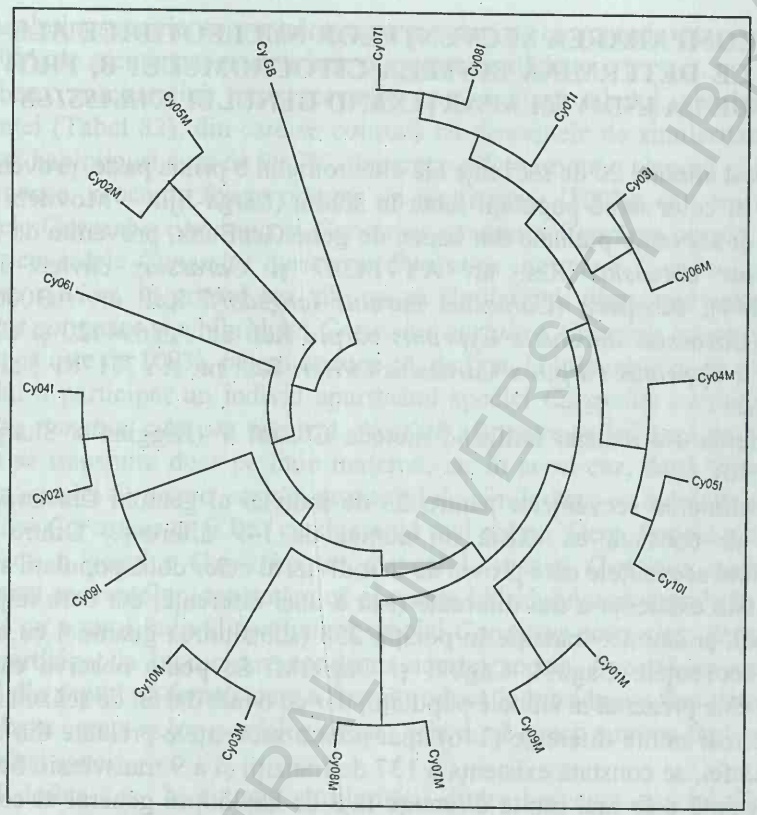


Figura 92. Arbore filogenetic circular al genului *Cyprinus*, realizat prin metoda ME pe baza secvenţelor ND4L

Din figurile 91 şi 92, pe baza diferenţelor dintre secvenţe şi a sumei lungimilor braţelor, se constată că individul a cărui secvenţă a fost preluată din banca de gene provine dintr-un nod comun ancestral, cu ramurile din care au evoluat speciile celor două populaţii. De asemenea, pentru cele două populaţii analizate, se observă că indivizii acestora se grupează diferenţiat. Se constată din cele două figuri că există diferenţe în cadrul arborelui, date de poziţiile ramurilor interioare, dar care nu prezintă o importanţă la fel de mare ca topologia (aspectul general al arborelui), care rămâne neschimbată şi care ne furnizează informaţiile necesare pentru direcţiile filogenetice ale haplotipului analizat.

BCU CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

5.8. COMPARAREA SECVENŢELOR NUCLEOTIDICE ALE GENEI CE DETERMINĂ SINTEZA CITOCROMULUI B, PROVENITE DE LA INDIVIZI APARŢINÂND GENULUI *CARASSIUS*

Au fost aliniate 20 de secvenţe ale citocromului b prima parte, provenite de la indivizi ai celor două populaţii luate în studiu (Larga-Jijia – Movileni şi Iaşi), precum şi secvenţe preluate din banca de gene GenBank, provenite de la specii (*Carassius carassius* Ref. nr. AY714387 şi *Carassius cuvieri* Ref. nr. AB045144), subspecii (*Carassius auratus langsdörfi* Ref. nr. AB006953) şi hibrizi (*Carassius auratus x Cyprinus carpio* Ref. nr. AY694420 şi *Carassius auratus x Cyprinus carpio x Carassius cuvieri* Ref. nr. AY771781) ai genului *Carassius*.

Alinierea s-a realizat utilizând metoda Clustal V (Higgins şi Sharp, 1989) (Anexa 10).

Din alinierea secvenţelor pentru 23 de indivizi ai genului *Carassius* şi doi hibrizi, se constată că există un număr de 149 diferenţe. Dintre acestea, comparând secvenţele care provin de la indivizi ai celor două populaţii analizate, se constată existenţa a trei diferenţe (sau a unei diferenţe, dar care implică trei secvenţe), şi anume: tranziţie în poziţia 258 (substituirea guaninei cu adenină), pentru secvenţele Cag01I, Cag07I şi Cag03M. Se poate observa că această mutaţie este prezentă în ambele populaţii, dar cu o rată destul de scăzută.

Cele mai multe diferenţe (146) apar pentru secvenţele preluate din banca de gene. Astfel, se constată existenţa a 137 de tranziţii şi a 9 transversii. Secvenţele care prezintă cele mai multe diferenţe faţă de haplotipul general al celor două populaţii sunt secvenţele speciei *Carassius cuvieri* şi a hibridului *Carassius auratus x Cyprinus carpio x Carassius cuvieri*; acestea diferă prin 38 de tranziţii şi 6 transversii. Majoritatea tranziţiilor produse au avut loc între citozină şi timină (25), în timp ce pentru adenină – guanină au fost înregistrate doar 15. Referitor la transversii, 2 s-au produs între guanină – citozină, una între adenină – timină şi una între adenină – citozină.

În cazul individului *Carassius auratus langsdörfi*, acesta diferă faţă de haplotipul general al celor două populaţii, prin 38 de mutaţii, dintre care 37 de tranziţii şi 1 transversie.

Specia *Carassius carassius* şi hibridul *Carassius auratus x Cyprinus carpio*, prezintă câte 11 diferenţe faţă de haplotipul general, din care 10 tranziţii şi o transversie (Gorgan, 2004a).

Din cele prezentate anterior, putem concluziona că au fost găsit 2 noi haplotipuri pentru citocromul b: un haplotip general (care va fi notat CagIMY), caracteristic secvenţelor care nu prezintă diferenţe în cadrul celor două populaţii,

şi un haplotip specific secvenţelor care prezintă acea mutaţie în poziţia 258 Cag137IM, de asemenea, caracteristic populaţiilor studiate.

Pe baza comparaţiei între secvenţe, s-a realizat tabelul similarităţii şi divergenţei (Tabel 82), din care se constată că procentele de similaritate pentru cele două haplotipuri sunt de 99,9%, deoarece diferă printr-o singură nucleotidă. De asemenea, procente foarte ridicate de similaritate (100%) se constată între secvenţele *Carassius carassius* şi *Carassius auratus x Cyprinus carpio*, precum şi între secvenţele *Carassius cuvieri* şi *Carassius auratus x Cyprinus carpio x Carassius cuvieri*. În primul caz, din cauza similarităţii dintre secvenţa speciei *Carassius carassius* şi a hibridului *Carassius auratus x Cyprinus carpio*, care s-a observat că este de 100%, putem deduce că, de fapt, la încrucişarea de obţinere a hibridului a participat un individ aparţinând speciei *Carassius carassius* şi nu *Carassius auratus*, cum s-a precizat. Această afirmaţie se bazează pe faptul că ADNmt se transmite doar pe linie maternă, iar în acest caz, dacă femela ar fi aparţinut speciei *Cyprinus carpio*, procentul de similaritate cu celelalte secvenţe ale genului *Carassius* ar fi fost cu siguranţă mai scăzut. Deci, femela a aparţinut unei specii a genului *Carassius* iar masculul, speciei *Cyprinus carpio*. Din compararea secvenţelor, constatăm că secvenţa hibridului corespunde în procent de 100% cu a unui individ aparţinând speciei *Carassius carassius*, deci, femela care a participat la încrucişare aparţinea acestei specii. Această eroare rezidă probabil din faptul că femela care a fost introdusă în hibridare a fost determinată doar pe baza caracterelor morfologice sau cele două specii sunt de fapt subspecii ale aceleiaşi specii.

În al doilea caz, în situaţia similarităţii dintre secvenţa speciei *Carassius cuvieri* şi cea a hibridului *Carassius auratus x Cyprinus carpio x Carassius cuvieri*, ţinând cont de faptul că ADNmt se transmite pe linie maternă, cea mai probabilă situaţie în acest caz este cea în care hibridul obţinut în urma încrucişării *Carassius auratus x Cyprinus carpio* este încrucişat cu o femelă aparţinând speciei *Carassius cuvieri*, caz în care, la nivel mitocondrial, va fi transmis doar ADN-ul provenit de la genitorul matern.

Ţinând cont de faptul că la *Cyprinidae* în general şi la reprezentanţii genului *Carassius* în special este întâlnit fenomenul de ginogeneză, şi în aceste cazuri este posibil să fie doar falşi hibrizi, adică indivizi ginogenetici. În acest caz, specia *Cyprinus carpio* nu a contribuit cu informaţia sa genetică la formarea descendenţilor, ci materialul seminal a avut doar un rol de iniţiere a diviziunii celulare.

Aceste două exemple demonstrează încă o dată importanţa studiilor de genetică şi filogenie moleculară în determinarea hibrizilor, a genitorilor acestora, precum şi a sexului genitorilor.

Tabel 82. Procentele de similaritate şi divergenţă pentru secvenţele haplotipurilor stabilite

	Procent de similaritate								
Procent de divergenţă		CagIMY	Cag137IM	Cacuv	Caulan	CaxCy	CaxCyx Ccuv	Ccaras	
	CagIMY		99,9	93,6	94,3	98,2	93,6	98,2	CagIMY
	Cag137IM	0,1		93,7	94,5	98,4	93,7	98,4	Cag137IM
	Cacuv	6,8	6,7		93,7	93,9	100,0	93,9	Cacuv
	Caulan	6,0	5,9	6,7		94,6	93,7	94,6	Caulan
	CaxCy	1,8	1,6	6,5	5,7		93,9	100,0	CaxCy
	CaxCyx Ccuv	6,8	6,7	0,0	6,7	6,5		93,9	CaxCyx Ccuv
	Ccaras	1,8	1,6	6,5	5,7	0,0	6,5		Ccaras
		CagIMY	Cag137IM	Cacuv	Caulan	CaxCy	CaxCyx Ccuv	Ccaras	

În plus, pentru a stabili o mai clară diferenţiere între toate noile haplotipuri, au fost analizate numărul şi procentele în care se găsesc bazele azotate în fiecare dintre acestea (Tabel 83).

Tabel 83. Procentul bazelor azotate, în cadrul haplotipurilor stabilite

Baze azotate		Specii analizate						
		CagIMY	Cag137IM	Ccaras	Ccuv	Caulan	CaxCy	CaxCyxCcuv
A	Nr.	198	199	202	194	198	202	194
	%	28,95	29,09	29,53	28,36	28,95	29,53	28,36
G	Nr.	100	99	97	101	101	97	101
	%	14,62	14,47	14,18	14,77	14,77	14,18	14,77
T	Nr.	203	203	200	205	198	200	205
	%	29,68	29,68	29,24	29,97	28,95	29,24	29,97
C	Nr.	183	183	185	184	187	185	184
	%	26,75	26,75	27,05	26,90	27,34	27,05	26,90
A+T	Nr.	401	402	402	399	396	402	399
	%	58,63	58,77	58,77	58,33	57,89	58,77	58,33
C+G	Nr.	283	282	282	285	288	282	285
	%	41,37	41,23	41,23	41,67	42,11	41,23	41,67

BCU MOLDOVA CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

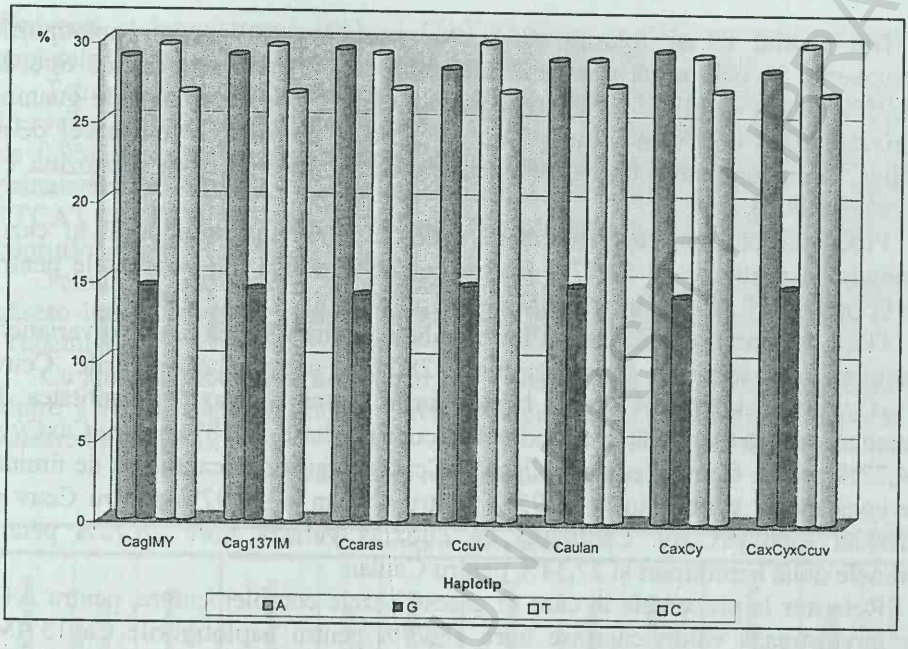


Figura 93. Graficul frecvenţei bazelor azotate în cadrul haplotipurilor caracterizate

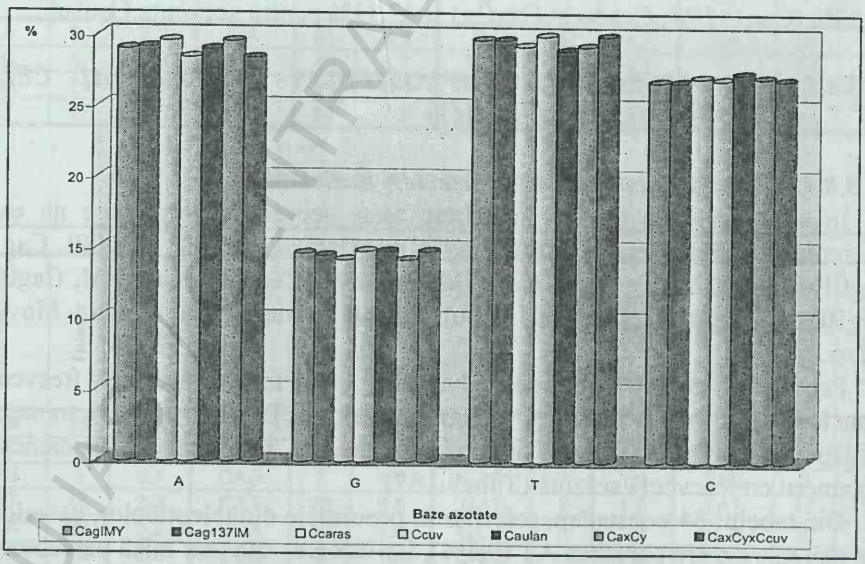


Figura 94. Graficul comparativ al frecvenţei bazelor azotate pentru haplotipurile analizate

BCU IAŞI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Din tabelul 83 şi figurile 93 şi 94 constatăm că, pentru haplotipurile descoperite în cele două populaţii analizate, concentraţia de adenină este de 28,95% pentru CagIMY şi 29,09% pentru Cag137IM. Cantitatea de guanină variază între 14,62% în cazul primului haplotip şi 14,47% pentru cel de-al doilea, timina are valori de 29,68% pentru ambele haplotipuri, ca şi citozina, cu o valoare de 26,75%.

Procentul bazelor complementare este de 58,63% pentru A+T în cazul primului haplotip şi de 58,77% pentru cel de-al doilea, iar procentele pentru C+G sunt de 41,37% pentru CagIMY şi 41,23% pentru Cag137IM.

Dacă urmărim valorile pentru întreg tabelul, constatăm că există o variaţie a cantităţii de adenină, cuprinsă între 28,36% pentru haplotipurile Ccuv, CyxCyxCcuv şi 29,53% pentru haplotipurile Ccaras şi CaxCy. Cantitatea de guanină variază asemănător, având valori cuprinse între 14,18% pentru CaxCy şi 14,77% pentru Ccuv, Caulan şi CaxCyxCcuv. Referitor la cantitatea de timină, se constată că variază între 28,95% pentru Caulan şi 29,97% pentru Ccuv şi hibridul CaxCyxCcuv. Cantitatea de citozină variază între 26,75% pentru primele două haplotipuri şi 27,34% pentru Caulan.

Referitor la procentele în care se găsesc bazele complementare, pentru A+T se înregistrează valori cuprinse între 58,77% pentru haplotipurile Cag137IM, Ccaras şi CaxCy şi 57,89% pentru Caulan, iar pentru C+G, valori cuprinse între 41,23% (Cag137IM, Ccaras şi CaxCy) şi 42,11% pentru secvenţa Caulan.

5.8.1. CARACTERIZAREA HAPLOTIPULUI GENERAL AL CELOR DOUĂ POPULAŢII (CAGIMY)

5.8.1.1. Frecvenţele tipurilor de asocieri nucleotidice

În acest haplotip au fost încadrate toate secvenţele între care nu există diferenţe (Cag02I, Cag03I, Cag04I, Cag05I, Cag06I, Cag08I, Cag09I, Cag10I, Cag01M, Cag02M, Cag04M, Cag05M, Cag06M, Cag07M, Cag08M, Cag09M, Cag10M), aparţinând celor două populaţii luate în studiu, Larga-Jijia – Movileni şi Iaşi.

Pentru a caracteriza acest haplotip, au fost calculate frecvenţele dinucleotidelor (Tabelul 84), trinucleotidelor (Tabelul 85), tetramerilor, pentamerilor şi hexamerilor (Tabelul 86), precum şi tetramerii, pentamerii şi hexamerii cu frecvenţă scăzută (Tabelul 87).

Din tabelul 84 constatăm, referitor la procentele dinucleotidelor, că valoarea cea mai mare o are perechea AT (9,8%), iar valoarea cea mai mică perechea GG, în proporţie de 3,2%. Referitor la trinucleotide (Tabelul 85), cea mai mare

frecvenţă o înregistrează tripletul CAT (3,8%), iar valoarea cea mai mică, tripletele GCG, GGT şi GTG, având o frecvenţă de 0,1%.

Tetramerul cu frecvenţa cea mai mare este CATT (1,9%), iar cei cu frecvenţa cea mai mică: TTAT, TAAT, CTTC, CTCA ŞI CCAT, toţi în procent de 0,9%. În cazul pentamerilor (Tabelul 86), cea mai mare frecvenţă o are pentamerul ACATT (0,9%), iar cea mai mică frecvenţă o au TTTCT, TTCTA, TTCAT şi TTCAC (0,4%). În ceea ce priveşte hexamerii, aceştia au frecvenţe cuprinse între 0,3% şi 0,4%.

Tetramerii, pentamerii şi hexamerii cu frecvenţă scăzută sunt cei care se găsesc într-un singur exemplar în întreaga genă, având o frecvenţă de 0,1% (Tabelul 87).

Cu ajutorul modulului EditSeq al DNA Star, a fost calculată temperatura de topire a ADN, după un model Davis-Botstein-Roth; în acest caz, prezintă o valoare de 81,13°C.

Tabel 84. Frecvenţa dinucleotidelor

Frecvenţa dinucleotidelor											
Dinucleotide	Număr	Frecvenţa (%)	Dinucleotide	Număr	Frecvenţa (%)	Dinucleotide	Număr	Frecvenţa (%)	Dinucleotide	Număr	Frecvenţa (%)
AA	50	7,3	CA	61	8,9	GA	32	4,7	TA	54	7,9
AC	57	8,3	CC	46	6,7	GC	28	4,1	TC	53	7,7
AG	24	3,5	CG	23	3,4	GG	22	3,2	TG	31	4,5
AT	67	9,8	CT	53	7,7	GT	18	2,6	TT	65	9,5

Tabel 85. Frecvenţa trinucleotidelor

Frecvenţa trinucleotidelor											
Trinucleotide	Număr	Frecvenţa (%)	Trinucleotide	Număr	Frecvenţa (%)	Trinucleotide	Număr	Frecvenţa (%)	Trinucleotide	Număr	Frecvenţa (%)
AAA	18	2,6	CAA	14	2,0	GAA	7	1,0	TAA	11	1,6
AAC	13	1,9	CAC	14	2,0	GAC	11	1,6	TAC	19	2,8
AAG	3	0,4	CAG	7	1,0	GAG	7	1,0	TAG	7	1,0
AAT	16	2,3	CAT	26	3,8	GAT	7	1,0	TAT	17	2,5
ACA	22	3,2	CCA	11	1,6	GCA	8	1,2	TCA	20	2,9
ACC	15	2,2	CCC	8	1,2	GCC	11	1,6	TCC	12	1,8
ACG	7	1,0	CCG	10	1,5	GCG	1	0,1	TCG	5	0,7
ACT	13	1,9	CCT	16	2,3	GCT	8	1,2	TCT	16	2,3
AGA	8	1,2	CGA	4	0,6	GGA	8	1,2	TGA	12	1,8

BCU CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

AGC	4	0,6	CGC	10	1,5	GGC	8	1,2	TGC	6	0,9
AGG	6	0,9	CGG	5	0,7	GGG	5	0,7	TGG	6	0,9
AGT	6	0,9	CGT	4	0,6	GGT	1	0,1	TGT	7	1,0
ATA	14	2,0	CTA	19	2,8	GTA	6	0,9	TTA	15	2,2
ATC	13	1,9	CTC	13	1,9	GTC	2	0,3	TTC	25	3,7
ATG	15	2,2	CTG	7	1,0	GTG	1	0,1	TTG	8	1,2
ATT	25	3,7	CTT	14	2,0	GTT	9	1,3	TTT	17	2,5

Tabel 86. Frecvenţele tetramerilor, pentamerilor şi hexamerilor

Frecvenţa tetramerilor			Frecvenţa pentamerilor			Frecvenţa hexamerilor		
Tetrameri	Număr	Frecvenţa (%)	Pentameri	Număr	Frecvenţa (%)	Hexameri	Număr	Frecvenţa (%)
CATT	13	1,9	ACATT	6	0,9	TTCTTC	3	0,4
TTCT	12	1,8	TTCTT	5	0,7	TTCTCC	3	0,4
TTCA	9	1,3	CCTAC	5	0,7	CTCCTA	3	0,4
TCAT	9	1,3	ATTTC	5	0,7	CATTTC	3	0,4
TTTC	8	1,2	ACAAA	5	0,7	ATTTCA	3	0,4
CTAC	8	1,2	TTTCA	4	0,6	AACATT	3	0,4
CCTA	8	1,2	TTCTC	4	0,6	TTTGAG	2	0,3
ATTC	8	1,2	TCATT	4	0,6	TTGAGG	2	0,3
ATTA	8	1,2	TAGTT	4	0,6	TTCTTT	2	0,3
TACT	7	1,0	GAAAC	4	0,6	TTACTC	2	0,3
TACA	7	1,0	CTACT	4	0,6	TGAGGA	2	0,3
CTTT	7	1,0	CATTC	4	0,6	TGAAAC	2	0,3
CAAA	7	1,0	CATTA	4	0,6	TCCTAC	2	0,3
ATTT	7	1,0	CATAC	4	0,6	TCATTC	2	0,3
ACAT	7	1,0	ATTCT	4	0,6	TCATTA	2	0,3
TTAT	6	0,9	ATACA	4	0,6	TCATAC	2	0,3
TAAT	6	0,9	TTTCT	3	0,4	TCAGAC	2	0,3
CTTC	6	0,9	TTCTA	3	0,4	TCAAAT	2	0,3
CTCA	6	0,9	TTCAT	3	0,4	TATGTT	2	0,3
CCAT	6	0,9	TTCAC	3	0,4	TATACA	2	0,3

Tabel 87. Tetrameri, pentameri şi hexameri cu frecvenţe scăzute

Tetrameri cu frecvenţă mică			Pentameri cu frecvenţă mică			Hexameri cu frecvenţă mică		
Tetrameri	Număr	Frecvenţa (%)	Pentameri	Număr	Frecvenţa (%)	Hexameri	Număr	Frecvenţa (%)
AAGC	1	0,1	AAAAA	1	0,1	AAAAAC	1	0,1

BCU IAŞI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

ACGG	1	0,1	AAAAC	1	0,1	AAAACA	1	0,1
AGAA	1	0,1	AAACT	1	0,1	AAAATC	1	0,1
AGCA	1	0,1	AAATC	1	0,1	AAAATT	1	0,1
AGCT	1	0,1	AACAG	1	0,1	AAACAC	1	0,1
CAAG	1	0,1	AACCC	1	0,1	AAACAG	1	0,1
CAGG	1	0,1	AACTC	1	0,1	AAACAT	1	0,1
CAGT	1	0,1	AACTT	1	0,1	AAACTT	1	0,1
CCCG	1	0,1	AAGAA	1	0,1	AAAGAA	1	0,1
CCCT	1	0,1	AAGAC	1	0,1	AAAGAC	1	0,1
CCGA	1	0,1	AAGCC	1	0,1	AAATAA	1	0,1
CCTG	1	0,1	AATAA	1	0,1	AAATAT	1	0,1
CGAG	1	0,1	AATCA	1	0,1	AAATCG	1	0,1
CGAT	1	0,1	AATCG	1	0,1	AAATTA	1	0,1
CGGA	1	0,1	AATGC	1	0,1	AAATTC	1	0,1
CGGG	1	0,1	AATGG	1	0,1	AAATTT	1	0,1
CGGT	1	0,1	ACAAT	1	0,1	AACACA	1	0,1
CGTG	1	0,1	ACACG	1	0,1	AACACG	1	0,1
CGTT	1	0,1	ACAGC	1	0,1	AACAGG	1	0,1
CTGC	1	0,1	ACAGG	1	0,1	AACCCC	1	0,1

5.8.1.2. Modelarea structurii secundare a ARNm

Utilizând modulul GeneQuest al programului DNA Star, a fost modelată structura ARN (Figura 95), pe baza unei energii minime de –77,21.

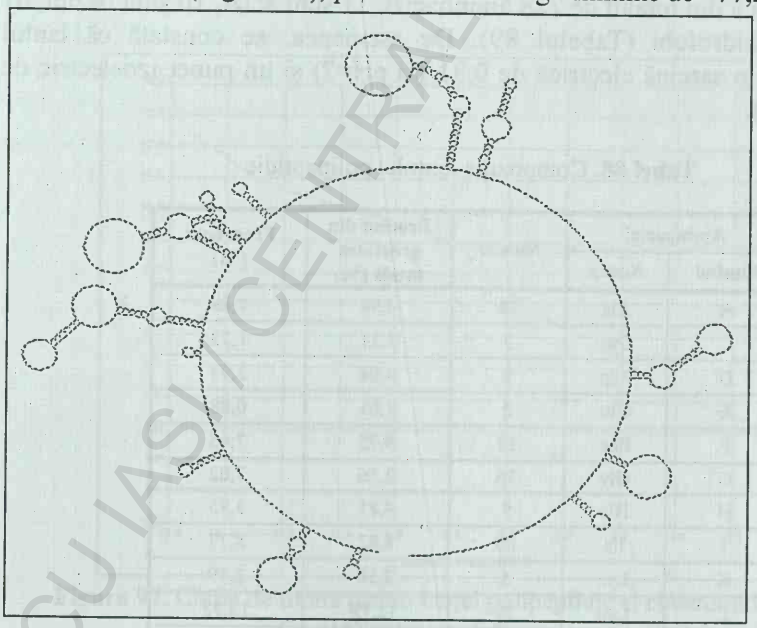


Figura 95. Modelarea structurii secundare a ARNm pentru haplotipul CagIMY al citocromului b, la specia *Carassius gibelio* Bloch.

BCU IAȘI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Din figura 95 şi Anexa 11 se observă că ARNm prezintă în structura secundară 47 regiuni monocatenare, alternând cu 24 regiuni bicatenare.

5.8.1.3. Translaţia şi caracterizarea catenei polipeptidice

Translaţia s-a realizat pe baza unui cod genetic mitocondrial pentru vertebrate, utilizând modulul EditSeq din cadrul programului DNA Star.

Catena polipeptidică obţinută este prezentată în Figura 96.

```
MASLRKTHPL IKIANDALVD LPTPSNISAW WNFGSLLGLC LITQILTGLF
LAMHYTSDIS TAFSSVTHIC RDVNYGWLIR NIHANGASFF FICIYMHIAR
GLYYGSYLYK ETWNIGVVLL LLVMMTAFVG YVLPWGQMSF WGATVITNLL
SAVPYMGDML VQWIWGGFSV DNATLTRFFA FHFLLPFIIA AATVIHLLFL
```

Figura 96. Catena polipeptidică a citocromului b caracteristică haplotipului CagIMY al speciei *Carassius gibelio* Bloch.

După realizarea translaţiei, se constată că întreg lanţul polipeptidic este alcătuit din 228 aminoacizi (Tabelul 88), din care se observă că frecvenţa cea mai mare o are leucina (15,08%), iar cea mai scăzută o are cisteina (1,06%).

Se constată că din totalul de 228 aminoacizi, 11 sunt acizi, 10 sunt bazici, 61 polari şi 105 hidrofobi (Tabelul 89). De asemenea, se constată că lanţul polipeptidic are o sarcină electrică de 0,31 (la pH=7) şi un punct izoelectric de 7,09 (Figura 97).

Tabel 88. Compoziţia lanţului polipeptidic

Aminoacizi		Număr	Procent din greutatea totală (%)	Frecvenţa (%)
Simbol	Nume			
A	Ala	18	4,98	7,89
C	Cys	3	1,21	1,32
D	Asp	9	4,04	3,95
E	Glu	2	1,01	0,88
F	Phe	17	9,75	7,46
G	Gly	16	3,56	7,02
H	His	9	4,81	3,95
I	Ile	20	8,82	8,77
K	Lys	5	2,50	2,19
L	Leu	29	12,79	12,72
M	Met	8	4,09	3,51

BCU IASI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

N	Asn	12	5,33	5,26
P	Pro	8	3,03	3,51
Q	Gln	3	1,50	1,32
R	Arg	5	3,04	2,19
S	Ser	17	5,77	7,46
T	Thr	13	5,91	6,58
V	Val	15	5,02	5,70
W	Trp	8	5,80	3,51
Y	Tyr	11	6,99	4,82
B	Asx	0	0,00	0,00
Z	Glx	0	0,00	0,00
.	Ter	0	0,00	0,00

Tabel 89. Caracterizarea lanţului polipeptidic

Greutate moleculară (Daltoni)	Număr de aminoacizi	Aminoacizi				Punct izoelectric	Sarcina electrică la pH=7	Concentraţia la o extincţie =1 şi λ=280nm
		Puternic bazici	Puternic acizi	Hidrofobi	Polari			
25666.07	228	10	11	105	61	7.098	0.311	0.43

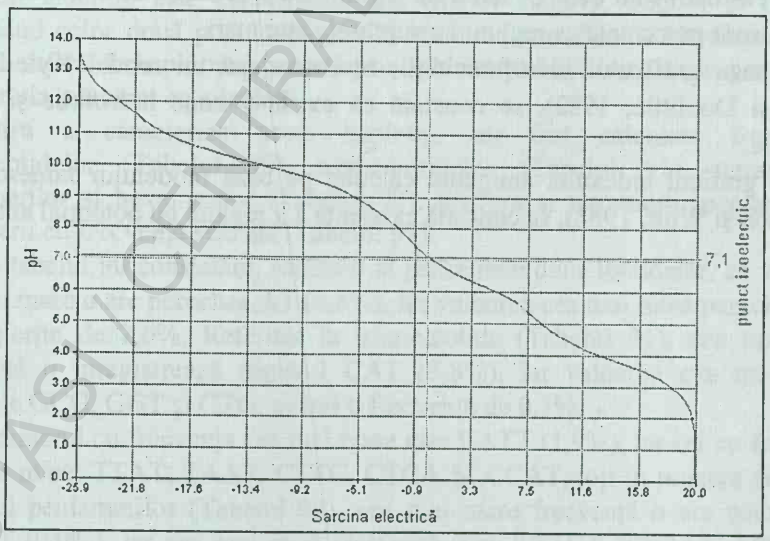


Figura 97. Curba de titrare pentru lanţul polipeptidic al citocromului b, haplotip CagIMY al speciei *Carassius gibelio*

BCU IAŞI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Ulterior, a fost realizată o analiză a structurii proteinei (Figura 98); astfel, au fost determinate zonele alfa helicoidale, beta pliate şi de inflexiune prin două metode, Garnier-Robson (Garnier *et al.*, 1978) şi Chou-Fasman (Chou şi Fasman, 1978); reprezentarea grafică a zonelor hidrofobe (Kyte şi Doolittle, 1982), zonele de flexie (Karplus şi Schultz, 1985), indexul antigenic (Jameson şi Wolf, 1988) şi graficul probabil al suprafeţei (Emini *et al.*, 1985).

Din analiza structurii lanţului polipeptidic se poate observa, referitor la regiunile alfa helicoidale, că există diferenţe între cele două metode Garnier-Robson şi Chou-Fasman. Astfel, în cazul primei metode, se observă că există 9 regiuni alfa helicoidale, în timp ce, potrivit celei de-a doua metode, există doar 4, cu 3 puncte de suprapunere a suprafeţelor. De asemenea, pentru regiunile beta pliate, se observă că există o similaritate relativă între cele două metode, comparativ cu regiunile alfa, în ceea ce priveşte suprafaţa acestor zone. Pentru determinarea efectuată prin prima metodă, se constată existenţa a 18 regiuni beta pliate, în timp ce pentru cea de-a doua metodă (Chou-Fasman), sunt considerate ca existând 7 astfel de regiuni. Referitor la zonele de inflexiune, de asemenea, comparativ pentru cele două metode, se constată că pentru prima metodă (Garnier-Robson) sunt prezentate 14 regiuni, iar prin a doua metodă (Chou-Fasman) sunt date 12 astfel de regiuni, cu precizarea că în cazul celei de-a doua, sunt prezentate ca regiuni cu suprafeţe mai mari.

Pe baza graficului hidrofobicităţii, realizat după un model Kyte-Doolitle (Kyte şi Doolittle, 1982), se constată că există 9 zone hidrofobe şi 7 zone hidrofile.

Din graficul indexului antigenic calculat pe baza modelului Jameson-Wolf (Jameson şi Wolf, 1988), se constată existenţa a 9 regiuni cu potenţial antigenic.

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

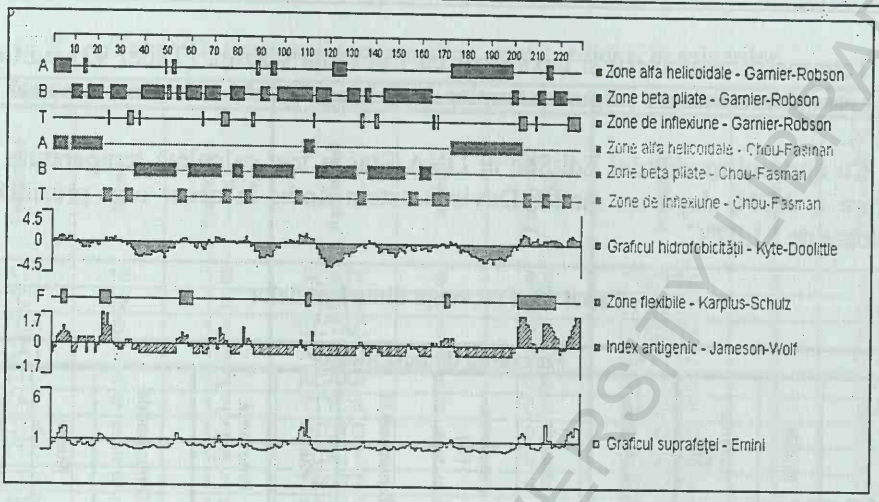


Figura 98. Analiza structurii lanţului polipeptidic

5.8.2. CARACTERIZAREA HAPLOTIPULUI CAG137IM

5.8.2.1. Frecvenţele tipurilor de asocieri nucleotidice

Acest haplotip este caracteristic secvenţelor Cag01I, Cag07I şi Cag03S, aparţinând celor două populaţii luate în studiu, Larga-Jijia – Movileni şi Iaşi. Acestea diferă de haplotipul general prin intervenţia unei tranziţii în poziţia 258 (substituţia guaninei cu adenină).

Pentru a caracteriza acest haplotip, au fost calculate frecvenţele dinucleotidelor (Tabelul 90), trinucleotidelor (Tabelul 91), tetramerilor, pentamerilor şi hexamerilor (Tabelul 92), precum şi tetramerii, pentamerii şi hexamerii cu frecvenţă scăzută (Tabelul 93).

Din tabelul 90 constatăm, referitor la procentele dinucleotidelor, că valoarea cea mai mare o are perechea AT (9,8%), iar valoarea cea mai mică perechea GT, în proporţie de 2,6%. Referitor la trinucleotide (Tabelul 91), cea mai mare frecvenţă o înregistrează tripletul CAT (3,8%), iar valoarea cea mai mică, tripletele GCG, GGT şi GTG, având o frecvenţă de 0,1%.

Tetramerul cu frecvenţa cea mai mare este CATT (1,9%), iar cei cu frecvenţa cea mai mică: TTAT, TAAT, CTTC, CTCA ŞI CCAT, toţi în procent de 0,9%. În cazul pentamerilor (Tabelul 92), cea mai mare frecvenţă o are pentamerul ACATT (0,9%), iar cea mai mică frecvenţă o au TTTCT, TTCAT, TTCTA şi TTCAC (0,4%). În ceea ce priveşte hexamerii, aceştia au frecvenţe cuprinse între 0,3% şi 0,4%.

Tetramerii, pentamerii şi hexamerii cu frecvenţă scăzută (Tabel 93) sunt cei care se găsesc într-un singur exemplar în întreaga genă, având o frecvenţă de 0,1%.

Cu ajutorul modulului EditSeq al DNA Star, a fost calculată temperatura de topire a ADN, după un model Davis-Botstein-Roth; în acest caz, prezintă o valoare de 81,07°C.

Tabel 90. Frecvenţa dinucleotidelor

Frecvenţa dinucleotidelor											
Dinucleotide	Număr	Frecvenţa (%)	Dinucleotide	Număr	Frecvenţa (%)	Dinucleotide	Număr	Frecvenţa (%)	Dinucleotide	Număr	Frecvenţa (%)
AA	50	7,3	CA	61	8,9	GA	33	4,8	TA	54	7,9
AC	57	8,3	CC	46	6,7	GC	28	4,1	TC	53	7,7
AG	25	3,7	CG	23	3,4	GG	20	2,9	TG	31	4,5
AT	67	9,8	CT	53	7,7	GT	18	2,6	TT	65	9,5

Tabel 91. Frecvenţa trinucleotidelor

Frecvenţa trinucleotidelor											
Trinucleotide	Număr	Frecvenţa (%)	Trinucleotide	Număr	Frecvenţa (%)	Trinucleotide	Număr	Frecvenţa (%)	Trinucleotide	Număr	Frecvenţa (%)
AAA	18	2,6	CAA	14	2,0	GAA	7	1,0	TAA	11	1,6
AAC	13	1,9	CAC	14	2,0	GAC	11	1,6	TAC	19	2,8
AAG	3	0,4	CAG	7	1,0	GAG	8	1,2	TAG	7	1,0
AAT	16	2,3	CAT	26	3,8	GAT	7	1,0	TAT	17	2,5
ACA	22	3,2	CCA	11	1,6	GCA	8	1,2	TCA	20	2,9
ACC	15	2,2	CCC	8	1,2	GCC	11	1,6	TCC	12	1,8
ACG	7	1,0	CCG	10	1,5	GCG	1	0,1	TCG	5	0,7
ACT	13	1,9	CCT	16	2,3	GCT	8	1,2	TCT	16	2,3
AGA	8	1,2	CGA	4	0,6	GGA	9	1,3	TGA	12	1,8
AGC	5	0,7	CGC	10	1,5	GGC	7	1,0	TGC	6	0,9
AGG	6	0,9	CGG	5	0,7	GGG	3	0,4	TGG	6	0,9
AGT	6	0,9	CGT	4	0,6	GGT	1	0,1	TGT	7	1,0
ATA	14	2,0	CTA	19	2,8	GTA	6	0,9	TTA	15	2,2
ATC	13	1,9	CTC	13	1,9	GTC	2	0,3	TTC	25	3,7
ATG	15	2,2	CTG	7	1,0	GTG	1	0,1	TTG	8	1,2
ATT	25	3,7	CTT	14	2,0	GTT	9	1,3	TTT	17	2,5

BOKU UNIVERSITÄT LIBRARY

Tabel 92. Frecvenţele tetramerilor, pentamerilor şi hexamerilor

Frecvenţa tetramerilor			Frecvenţa pentamerilor			Frecvenţa hexamerilor		
Tetrameri	Număr	Frecvenţa (%)	Pentameri	Număr	Frecvenţa (%)	Hexameri	Număr	Frecvenţa (%)
CATT	13	1,9	ACATT	6	0,9	TTCTTC	3	0,4
TTCT	12	1,8	TTCTT	5	0,7	TTCTCC	3	0,4
TTCA	9	1,3	CCTAC	5	0,7	CTCCTA	3	0,4
TCAT	9	1,3	ATTTC	5	0,7	CATTTC	3	0,4
TTTC	8	1,2	ACAAA	5	0,6	ATTTCA	3	0,4
CTAC	8	1,2	TTTCA	4	0,6	AACATT	3	0,4
CCTA	8	1,2	TTCTC	4	0,6	TTTGAG	2	0,3
ATTC	8	1,2	TCATT	4	0,6	TTGAGG	2	0,3
ATTA	8	1,2	TAGTT	4	0,6	TTCTTT	2	0,3
TACT	7	1,0	GAAAC	4	0,6	TTACTC	2	0,3
TACA	7	1,0	CTACT	4	0,6	TGAGGA	2	0,3
CTTT	7	1,0	CATTC	4	0,6	TGAAAC	2	0,3
CAAA	7	1,0	CATTA	4	0,6	TCCTAC	2	0,3
ATTT	7	1,0	CATAC	4	0,6	TCATTC	2	0,3
ACAT	7	1,0	ATTCT	4	0,6	TCATTA	2	0,3
TTAT	6	0,9	ATACA	4	0,6	TCATAC	2	0,3
TAAT	6	0,9	TTTCT	3	0,4	TCAGAC	2	0,3
CTTC	6	0,9	TTCTA	3	0,4	TCAAAT	2	0,3
CTCA	6	0,9	TTCAT	3	0,4	TATGTT	2	0,3
CCAT	6	0,9	TTCAC	3	0,4	TATACA	2	0,3

Tabel 93. Tetrameri, pentameri şi hexameri cu frecvenţe scăzute

Tetrameri cu frecvenţă mică			Pentameri cu frecvenţă mică			Hexameri cu frecvenţă mică		
Tetrameri	Număr	Frecvenţa (%)	Pentameri	Număr	Frecvenţa (%)	Hexameri	Număr	Frecvenţa (%)
AAGC	1	0,1	AAAAA	1	0,1	AAAAAC	1	0,1
ACGG	1	0,1	AAAAC	1	0,1	AAAACA	1	0,1
AGAA	1	0,1	AAACT	1	0,1	AAAATC	1	0,1
AGCT	1	0,1	AAATC	1	0,1	AAAATT	1	0,1
CAAG	1	0,1	AACAG	1	0,1	AAACAC	1	0,1
CAGG	1	0,1	AACCC	1	0,1	AAACAG	1	0,1
CAGT	1	0,1	AACTC	1	0,1	AAACAT	1	0,1
CCCG	1	0,1	AACTT	1	0,1	AAACTT	1	0,1
CCCT	1	0,1	AAGAA	1	0,1	AAAGAA	1	0,1
CCGA	1	0,1	AAGAC	1	0,1	AAAGAC	1	0,1
CCTG	1	0,1	AAGCC	1	0,1	AAATAA	1	0,1
CGAG	1	0,1	AATAA	1	0,1	AAATAT	1	0,1

BCU CLUJ / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

CGAT	1	0,1	AATCA	1	0,1	AAATCG	1	0,1
CGGA	1	0,1	AATCG	1	0,1	AAATTA	1	0,1
CGGG	1	0,1	AATGC	1	0,1	AAATTC	1	0,1
CGGT	1	0,1	AATGG	1	0,1	AAATTT	1	0,1
CGTG	1	0,1	ACAAT	1	0,1	AACACA	1	0,1
CGTT	1	0,1	ACACG	1	0,1	AACACG	1	0,1
CTGC	1	0,1	ACAGC	1	0,1	AACAGG	1	0,1
CTTA	1	0,1	ACAGG	1	0,1	AACCCC	1	0,1

5.8.2.2. Modelarea structurii secundare a ARNm

Deoarece există o singură diferență, constând în înlocuirea unei nucleotide, structura generală a ARNm este similară structurii ARNm al haplotipului general pentru această genă. Singura diferență în acest caz, față de structura anterioară, este dată de existența adeninei în locul guaninei. Ca şi în cazul precedent, ARNm prezintă 47 regiuni monocatenare, alternând cu 24 regiuni bicatenare.

5.8.2.3. Translația şi caracterizarea catenei polipeptidice

Translația s-a realizat pe baza unui cod genetic mitocondrial pentru vertebrate, utilizând modulul EditSeq din cadrul programului DNA Star.

Catena polipeptidică obținută este prezentată în Figura 99.

```
MASLRKTHPL IKIANDALVD LPTPSNISAW WNFGSLLGLC LITQILTGLF
LAMHYTSDIS TAFSSVTHIC RDVNYGWLIR NIHANGASFF FICIYMHIAR
GLYYGSYLYK ETWNIGVVLL LLVMMTAFVG YVLPWGQMSF WGATVITNLL
SAVPYMGDML VQWIWGGFSV DNATLTRFFA FHFLLPFIIA AATVIHLLFL
           HETGSNNPIG LNSDADKISF HPYFSYKD
```

Figura 99. Catena polipeptidică a citocromului b caracteristică haplotipului Cag137IM al speciei *Carassius gibelio Bloch.*

După realizarea translației, se constată că întreg lanțul polipeptidic este alcătuit din 228 aminoacizi (Tabelul 94), din care se observă că frecvența cea mai mare, o are leucina (15,08%), iar cea mai scăzută o are cisteina (1,06%). Se constată, de asemenea, existența a doi codoni stop (notați cu „.") către sfârşitul lanțului polipeptidic.

Se constată că din totalul de 228 aminoacizi, 11 sunt acizi, 10 sunt bazici, 61 polari şi 105 hidrofobi. De asemenea, se constată că lanțul polipeptidic are o sarcină electrică de 0,31 (la pH=7) şi un punct izoelectric de 7,09.

Tabel 94. Compoziţia lanţului polipeptidic

Aminoacizi		Număr	Procent din greutatea totală (%)	Frecvenţa (%)
Simbol	Nume			
A	Ala	18	4,98	7,89
C	Cys	3	1,21	1,32
D	Asp	9	4,04	3,95
E	Glu	2	1,01	0,88
F	Phe	17	9,75	7,46
G	Gly	16	3,56	7,02
H	His	9	4,81	3,95
I	Ile	20	8,82	8,77
K	Lys	5	2,50	2,19
L	Leu	29	12,79	12,72
M	Met	8	4,09	3,51
N	Asn	12	5,33	5,26
P	Pro	8	3,03	3,51
Q	Gln	3	1,50	1,32
R	Arg	5	3,04	2,19
S	Ser	17	5,77	7,46
T	Thr	13	5,91	6,58
V	Val	15	5,02	5,70
W	Trp	8	5,80	3,51
Y	Tyr	11	6,99	4,82
B	Asx	0	0,00	0,00
Z	Glx	0	0,00	0,00
.	Ter	0	0,00	0,00

5.8.3. RELAŢII FILOGENETICE ÎN CADRUL GENULUI CARASSIUS, BAZATE PE DIFERENŢE ALE SECVENŢELOR GENEI CE DETERMINĂ SINTEZA CITOCROMULUI B

Metodele folosit în filogenie şi modalităţile de realizare a arborilor filogenetici, utilizate în acest caz, sunt cele care includ tranziţiile şi transversiile, deoarece haplotipurile analizate pentru cele două populaţii prezintă ambele tipuri de mutaţii.

BCU CLUJ CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

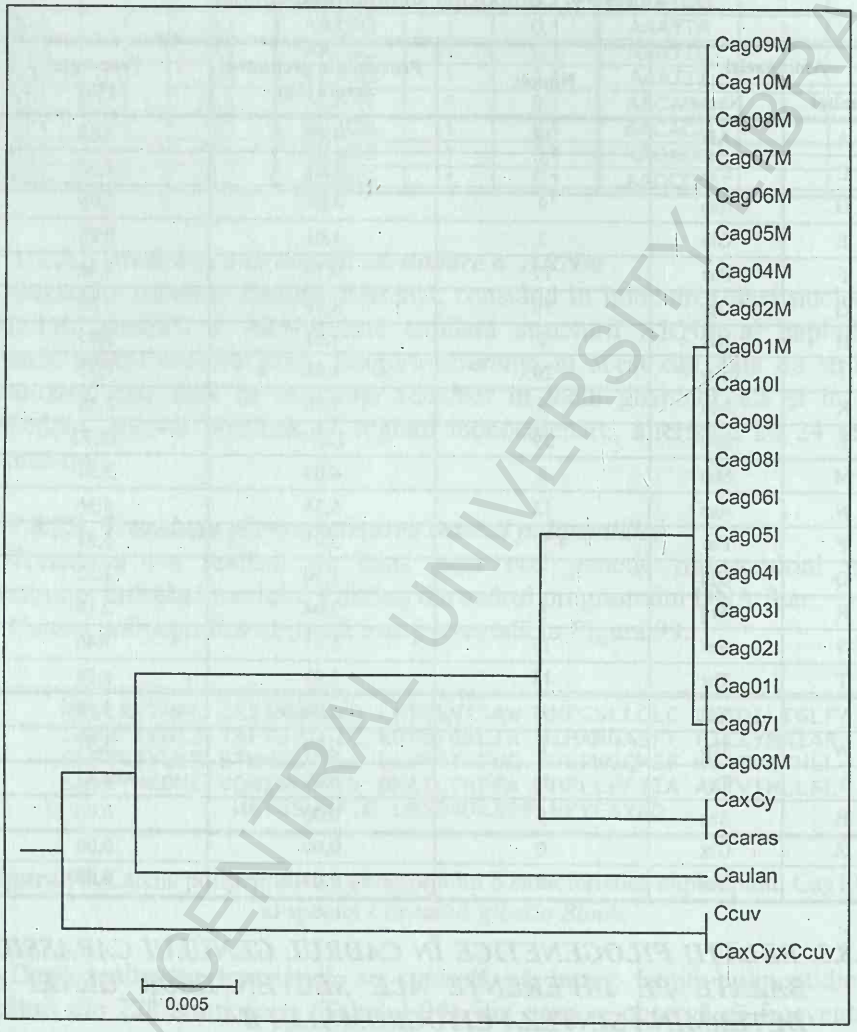


Figura 100. Arbore filogenetic rectangular al genului *Carassius*, realizat prin metoda UPGMA pe baza secvenţelor citocromului B

BCU IAŞI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

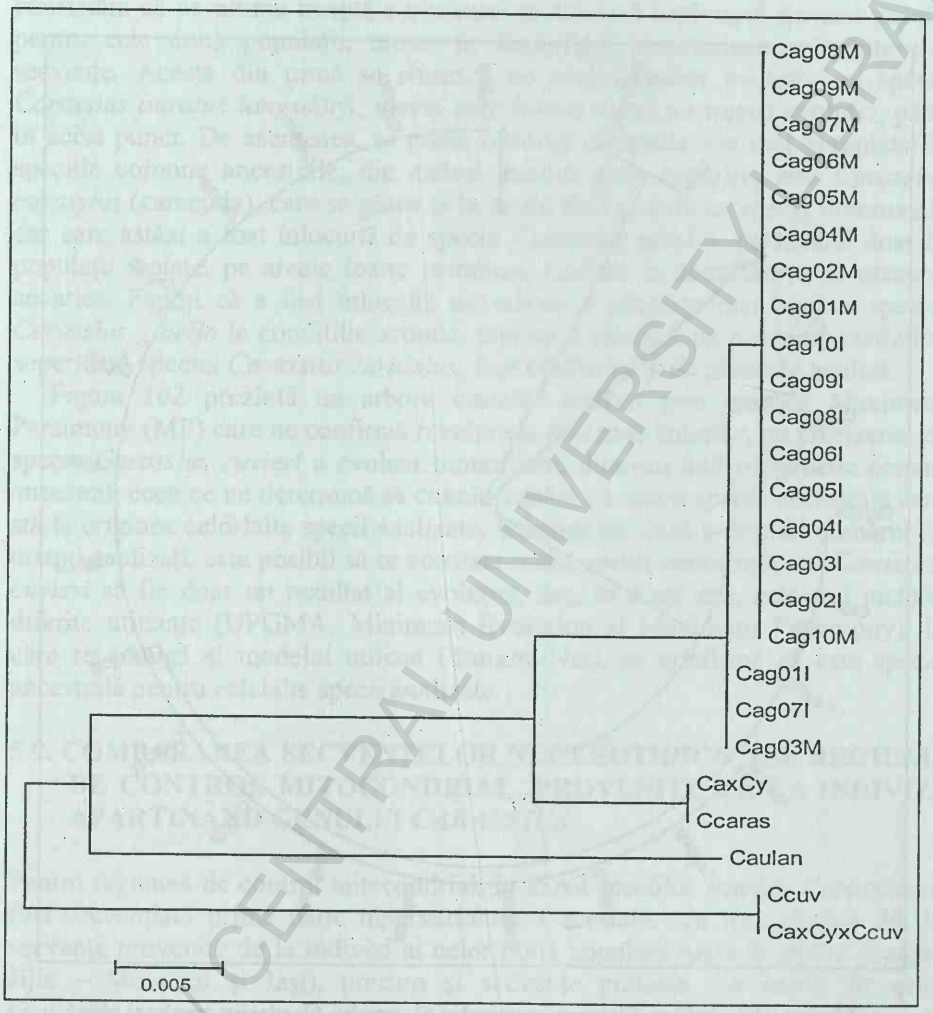


Figura 101. Arbore filogenetic rectangular al genului *Carassius*, realizat prin metoda ME pe baza secvențelor citocromului B

Astfel, prin metoda UPGMA bazată pe modelul Tamura-Nei, care include ambele tipuri de mutații posibile (tranziții și transversii), a fost obținut un arbore filogenetic (Figura 100), din care se observă că Cy06 derivă direct dintr-un nod comun ancestral, din care derivă și brațul comun al celorlalte secvențe.

BCU IAȘI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

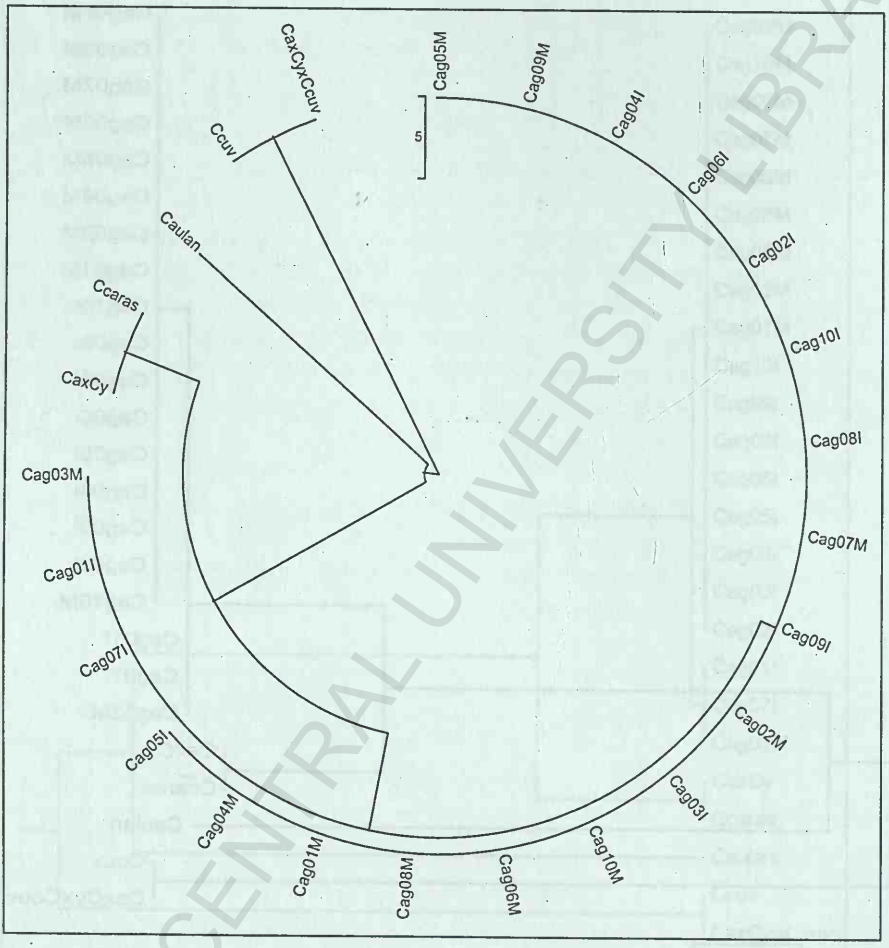


Figura 102. Arbore filogenetic circular al genului *Carassius*, realizat prin metoda MP pe baza secvenţelor citocromului B

Din figura 101 se constată grupele evolutive ale speciilor analizate, în care se încadrează secvenţele pe baza similarităţilor existente, aşa cum au fost încadrate şi în cazul analizei procentelor de similaritate.

Arborele filogenetic din figura 101, realizat prin metoda evoluţiei minime (ME), utilizând un algoritm Neighbor-Joining, ne furnizează informaţii referitoare la distanţele existente între grupele stabilite anterior. Astfel,

BCU IAŞI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

constatăm că pe ultima treaptă a evoluţiei se situează haplotipul general stabilit pentru cele două populaţii, urmat de haplotipul caracteristic celorlalte trei secvenţe. Acesta din urmă se situează pe acelaşi palier evolutiv cu specia *Carassius auratus langsdörfi*, specie care însă a urmat alt traseu evolutiv, până în acest punct. De asemenea, se poate observa că specia cea mai apropiată de speciile comune ancestrale, din cadrul acestui grup evolutiv, este *Carassius carassius* (caracuda), care se găsea şi în apele ţării noastre ca specie dominantă, dar care astăzi a fost înlocuită de specia *Carassius gibelio*, persistând doar în populaţii izolate, pe areale foarte restrânse, limitate la doar câteva ecosisteme acvatice. Faptul că a fost înlocuită dovedeşte o adaptare mai bună a speciei *Carassius gibelio* la condiţiile actuale, fapt ce o situează pe o treaptă evolutivă superioară speciei *Carassius carassius*, fapt confirmat şi de prezenta analiză.

Figura 102 prezintă un arbore circular realizat prin metoda Maximum Parsimony (MP) care ne confirmă rezultatele discutate anterior, cu precizarea că specia *Carassius cuvieri* a evoluat monofiletic dintr-un nod filogenetic comun ancestral, ceea ce ne determină să concluzionăm că este o specie ancestrală care stă la originea celorlalte specii analizate. Bineînţeles, dacă s-ar mări numărul de taxoni analizaţi, este posibil să se constate o altă specie ancestrală, iar *Carassius cuvieri* să fie doar un rezultat al evoluţiei, dar, în acest caz, cele trei metode diferite utilizate (UPGMA, Minimum Evolution şi Maximum Parsimony), la care se adaugă şi modelul utilizat (Tamura-Nei), ne confirmă că este specie ancestrală pentru celelalte specii analizate.

5.9. COMPARAREA SECVENŢELOR NUCLEOTIDICE ALE REGIUNII DE CONTROL MITOCONDRIAL, PROVENITE DE LA INDIVIZI APARŢINÂND GENULUI *CARASSIUS*

Pentru regiunea de control mitocondrial, în cazul speciilor genului *Carassius*, a fost secvenţiată prima parte hipervariabilă a acesteia. Au fost aliniate 20 de secvenţe provenite de la indivizi ai celor două populaţii luate în studiu (Larga-Jijia – Movileni şi Iaşi), precum şi secvenţe preluate din banca de gene GenBank, provenite de la specii (*Carassius carassius* Ref. nr. AY714387 şi *Carassius cuvieri* Ref. nr. AB045144), subspecii (*Carassius auratus langsdörfi* Ref. nr. AB006953) şi hibrizi (*Carassius auratus x Cyprinus carpio* Ref. nr. AY694420 şi *Carassius auratus x Cyprinus carpio x Carassius cuvieri* Ref. nr. AY771781) ai genului *Carassius*.

Alinierea s-a realizat utilizând metoda Clustal V (Higgins şi Sharp, 1989) (Anexa 12) şi a fost verificată prin metoda Clustal W (Thompson *et al.*, 1994), obţinându-se în ambele cazuri acelaşi rezultat.

Din alinierea secvenţelor, se observă că există un număr de 82 diferenţe între cele 25 de secvenţe, dintre care 64 tranziţii, 12 transversii, 3 inversii şi 3 deleţii.

Între secvenţele celor două populaţii analizate, se constată existenţa a două diferenţe (sau o diferenţă care implică două secvenţe, comparativ cu celelalte secvenţe similare ale aceloraşi populaţii) ce constau în existenţa unei tranziţii pentru fiecare dintre cele două secvenţe în poziţia 133, unde a avut loc substituţia timinei de către citozină.

Referitor la celelalte secvenţe preluate din banca de gene, se constată că cele mai multe diferenţe (21) faţă de haplotipul general al celor două populaţii analizate le prezintă secvenţa speciei *Carassius cuvieri*, care are acelaşi număr de diferenţe cu secvenţa hibridului *Carassius auratus x Cyprinus carpio x Carassius cuvieri*. Pentru secvenţele speciei *Carasius carassius* şi ale hibridului *Carassius auratus* x *Cyprinus carpio*, de asemenea, se înregistrează un număr egal de mutaţii (11), dintre care 10 tranziţii şi o deleţie.

Pe baza comparaţiei între secvenţe, s-a realizat tabelul similarităţii şi divergenţei (Tabel 95), din care se constată că procentele de similaritate pentru cele două haplotipuri ale populaţiilor analizate sunt de 99,6%. De asemenea, procente foarte ridicate de similaritate (100%) se constată între secvenţele *Carassius carassius* şi *Carassius auratus x Cyprinus carpio*, precum şi între secvenţele *Carassius cuvieri* şi *Carassius auratus x Cyprinus carpio x Carassius cuvieri*.

Tabel 95. Procentele de similaritate şi divergenţă pentru secvenţele haplotipurilor stabilite

	Procent de similaritate								
Procent de divergenţă		CaglMD	Cag25ID	Cacuv	Caulan	CaxCy	CaxCyx Ccuv	Ccaras	
	CaglMD		99,6	91,1	74,3	73,1	91,1	73,1	CaglMD
	Cag25ID	0,4		90,7	73,9	72,7	90,7	72,7	Cag137IM
	Cacuv	9,7	10,2		70,2	69,0	100,0	69,0	Cacuv
	Caulan	31,5	32,1	38,0		94,7	70,2	94,7	Caulan
	CaxCy	33,4	34,0	40,0	5,6		69,0	100,0	CaxCy
	CaxCyx Ccuv	9,7	10,2	0,0	38,0	40,0		69,0	CaxCyx Ccuv

BCU IAŞI / CENTRALA UNIVERSITARĂ LIBRARY

	Ccaras	33,4	34,0	40,0	5,6	0,0	40,0		Ccaras
		CagIMD	Cag25ID	Cacuv	Caulan	CaxCy	CaxCyx Ccuv	Ccaras	

Pe baza comparaţiei între secvenţe, precum şi a procentelor de similaritate, constatăm că au fost găsit 2 noi haplotipuri pentru specia *Carassius gibelio* Bloch şi cele două populaţii analizate – un haplotip general CagIMD şi unul caracteristic doar populaţiei Iaşi Cag25ID.

În plus, pentru a stabili o mai clară diferenţiere între toate noile haplotipuri, au fost analizate numărul şi procentele în care se găsesc bazele azotate în fiecare dintre acestea (Tabel 97).

Tabel 96. Procentul bazelor azotate, în cadrul haplotipurilor stabilite

Baze azotate		Specii analizate						
		CagIMD	Cag25ID	Ccaras	Ccuv	Caulan	CaxCy	CaxCyxCcuv
A	Nr.	91	91	91	94	91	91	94
	%	36,99	36,99	37,45	38,21	37,45	37,45	38,21
G	Nr.	38	38	35	38	33	35	38
	%	15,45	15,45	14,40	15,45	13,58	14,40	15,45
T	Nr.	77	76	74	73	74	74	73
	%	31,30	30,89	30,45	29,67	30,45	30,45	29,67
C	Nr.	40	41	43	41	45	43	41
	%	16,26	16,67	17,70	16,67	18,52	17,70	16,67
A+T	Nr.	168	167	165	167	165	165	167
	%	68,29	67,89	67,90	67,89	67,90	67,90	67,89
C+G	Nr.	78	79	78	79	78	78	79
	%	31,71	32,11	32,10	32,11	32,10	32,10	32,11

BCU IAŞI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

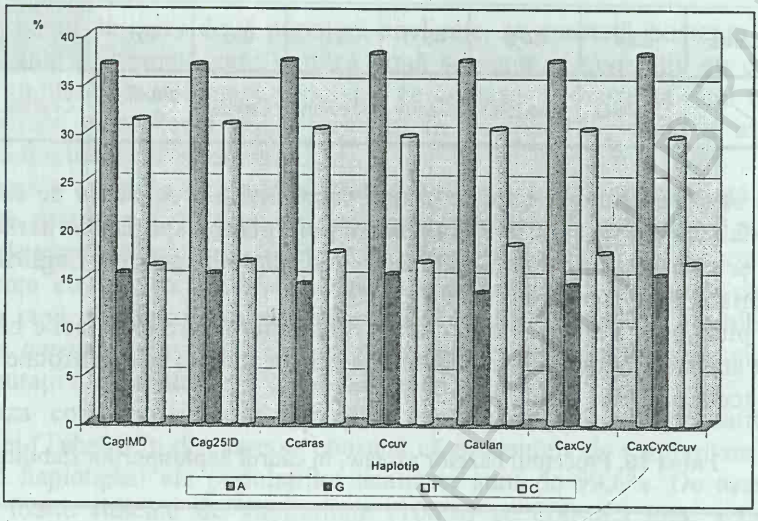


Figura 103. Graficul frecvenței bazelor azotate în cadrul haplotipurilor caracterizate

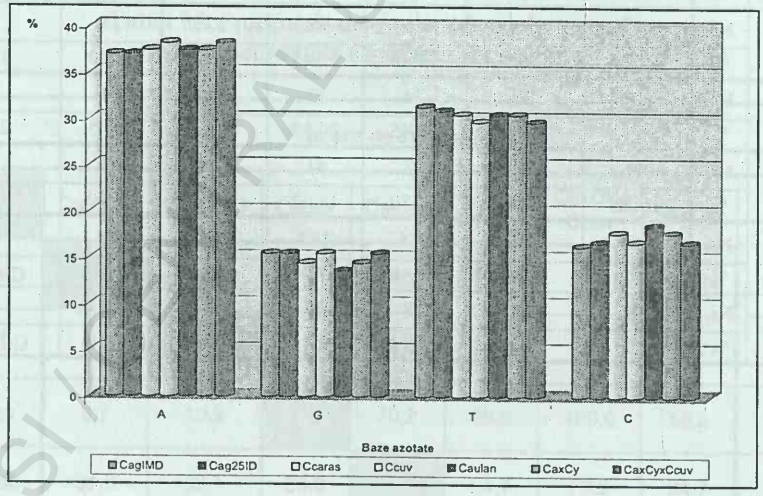


Figura 104. Graficul frecvenței bazelor azotate, comparativ între haplotipurile analizate

Din tabelul 97 şi figurile 103 şi 104, constatăm că pentru haplotipurile descoperite în cele două populații analizate, concentrația de adenină este de

36,99% pentru ambele haplotipuri analizate, ca şi cantitatea de guanină, care este de 15,45%. Timina are valori de 31,30% pentru haplotipul CagIMD şi 30,89% pentru haplotipul Cag25ID, iar citozina, valori de 18,26% pentru primul haplotip şi 16,67% pentru cel de-al doilea.

Procentul bazelor complementare este de 68,29% pentru A+T în cazul primului haplotip şi de 67,89% pentru cel de-al doilea, iar procentele pentru C+G sunt de 31,71% pentru CagIMD şi 32,11% pentru Cag25ID.

Dacă urmărim valorile pentru întreg tabelul 115, constatăm că există o variaţie a cantităţii de adenină, cuprinsă între 36,99% pentru haplotipurile celor două populaţii şi 38,21% pentru haplotipurile Ccuv şi CaxCyxCcuv. Cantitatea de guanină variază asemănător, având valori cuprinse între 13,58% pentru Caulan şi 15,45% pentru cele două haplotipuri analizate, Ccuv, şi CaxCyxCcuv. Referitor la cantitatea de timină, se constată că variază între 29,67% pentru Ccuv şi hibridul CaxCyxCcuv şi 31,30% pentru haplotipul CagIMD. Cantitatea de citozină variază între 16,26% pentru primul haplotip şi 18,52% pentru Caulan.

Referitor la procentele în care se găsesc bazele complementare, pentru A+T se înregistrează valori cuprinse între 67,89% pentru haplotipurile Cag25ID, Ccuv şi CaxCyxCcuv şi 68,29% pentru CagIMD, iar pentru C+G, valori cuprinse între 31,71% (CagIMD) şi 32,11% pentru secvenţele Cag25ID, Ccuv şi CaxCyxCcuv.

5.9.1. CARACTERIZAREA HAPLOTIPULUI GENERAL AL CELOR DOUĂ POPULAŢII (CAGIMD)

5.9.1.1. Frecvenţele tipuilor de asocieri nucleotidice

În acest haplotip au fost încadrate toate secvenţele între care nu există diferenţe (Cag01I, Cag03I, Cag04I, Cag06I, Cag07I, Cag08I, Cag09I, Cag10I, Cag01M, Cag02M, Cag03M, Cag04M, Cag05M, Cag06M, Cag07M, Cag08M, Cag09M, Cag10M), aparţinând celor două populaţii luate în studiu, Larga-Jijia – Movileni şi Iaşi.

Pentru a caracteriza acest haplotip, au fost calculate frecvenţele dinucleotidelor (Tabelul 97), trinucleotidelor (Tabelul 98), tetramerilor, pentamerilor şi hexamerilor (Tabelul 99), precum şi tetramerii, pentamerii şi hexamerii cu frecvenţă scăzută (Tabelul 100).

Din tabelul 97 constatăm, referitor la procentele dinucleotidelor, că valoarea cea mai mare o au perechile AA şi AT (13,1%), iar valoarea cea mai mică perechea CG, în proporţie de 0,4%. Referitor la trinucleotide (Tabelul 99), cea mai mare frecvenţă o înregistrează tripletele AAT şi TAA (4,9%), iar valoarea

cea mai mică, tripletele AGC, CCG, CGG, CTG, GAT şi GTC, având o frecvenţă de 0,4%. În plus, se constată lipsa trimerilor CGA, CGC, CGT, GCC, GCG, GCT, GGC şi TCG.

Tetramerul cu frecvenţa cea mai mare este TATT (2,5%), iar cei cu frecvenţa cea mai mică se găsesc în procent de 1,2%. În cazul pentamerilor (Tabelul 99), cea mai mare frecvenţă o au pentamerii TTATT, TATTA, AACTA şi AAATT (1,2%), iar toţi ceilalţi au frecvenţe foarte mici (0,8%). În ceea ce priveşte hexamerii, aceştia au frecvenţe cuprinse între 0,8% şi 0,4%.

Tetramerii, pentamerii şi hexamerii cu frecvenţă scăzută (Tabelul 100) sunt cei care se găsesc într-un singur exemplar în întreaga genă, având o frecvenţă de 0,4%.

Cu ajutorul modulului EditSeq al DNA Star, a fost calculată temperatura de topire a ADN, după un model Davis-Botstein-Roth; în acest caz, prezintă o valoare de 75,87°C.

Tabel 97. Frecvenţa dinucleotidelor

Frecvenţa dinucleotidelor											
Dinucleotide	Număr	Frecvenţa (%)	Dinucleotide	Număr	Frecvenţa (%)	Dinucleotide	Număr	Frecvenţa (%)	Dinucleotide	Număr	Frecvenţa (%)
AA	32	13,1	CA	20	8,2	GA	11	4,5	TA	28	11,4
AC	16	6,5	CC	9	3,7	GC	3	1,2	TC	12	4,9
AG	11	4,5	CG	1	0,4	GG	12	4,9	TG	14	5,7
AT	32	13,1	CT	10	4,1	GT	11	4,5	TT	23	9,4

Tabel 98. Frecvenţa trinucleotidelor

Frecvenţa trinucleotidelor											
Trinucleotide	Număr	Frecvenţa (%)	Trinucleotide	Număr	Frecvenţa (%)	Trinucleotide	Număr	Frecvenţa (%)	Trinucleotide	Număr	Frecvenţa (%)
AAA	7	2,9	CAA	7	2,9	GAA	6	2,5	TAA	12	4,9
AAC	5	2,0	CAC	4	1,6	GAC	4	1,6	TAC	3	1,2
AAG	8	3,3	CAG	1	0,4	GAG	0	0,0	TAG	2	0,8
AAT	12	4,9	CAT	8	3,3	GAT	1	0,4	TAT	11	4,5
ACA	7	2,9	CCA	3	1,2	GCA	3	1,2	TCA	7	2,9
ACC	3	1,2	CCC	3	1,2	GCC	0	0,0	TCC	3	1,2

BCU CLUJ / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

ACG	0	0,0	CCG	1	0,4	GCG	0	0,0	TCG	0	0,0
ACT	6	2,5	CCT	2	0,8	GCT	0	0,0	TCT	2	0,8
AGA	4	1,6	CGA	0	0,0	GGA	2	0,8	TGA	5	2,0
AGC	1	0,4	CGC	0	0,0	GGC	0	0,0	TGC	2	0,8
AGG	4	1,6	CGG	1	0,4	GGG	5	2,0	TGG	2	0,8
AGT	2	0,8	CGT	0	0,0	GGT	4	1,6	TGT	5	2,0
ATA	10	4,1	CTA	3	1,2	GTA	5	2,0	TTA	9	3,7
ATC	5	2,0	CTC	3	1,2	GTC	1	0,4	TTC	3	1,2
ATG	6	2,5	CTG	1	0,4	GTG	2	0,8	TTG	5	2,0
ATT	11	4,5	CTT	3	1,2	GTT	3	1,2	TTT	6	2,5

Tabel 99. Frecvențele tetramerilor, pentamerilor și hexamerilor

Frecventa tetramerilor			Frecventa pentamerilor			Frecventa hexamerilor		
Tetrameri	Număr	Frecvența (%)	Pentameri	Număr	Frecvența (%)	Hexameri	Număr	Frecvența (%)
TATT	6	2,5	TTATT	3	1,2	TTATTC	2	0,8
ATTA	5	2,1	TATTA	3	1,2	TAAGGT	2	0,8
ATAT	5	2,1	AACTA	3	1,2	TAAATT	2	0,8
ACAT	5	2,1	AAATT	3	1,2	GACTCA	2	0,8
AATT	5	2,1	TTTAT	2	0,8	CTCACA	2	0,8
TTAT	4	1,6	TTAAG	2	0,8	CAACTA	2	0,8
TTAA	4	1,6	TCACA	2	0,8	ATTATT	2	0,8
TATA	4	1,6	TATTC	2	0,8	ATATTA	2	0,8
TAAT	4	1,6	TATAT	2	0,8	ATAAAG	2	0,8
TAAG	4	1,6	TACAT	2	0,8	AATTGT	2	0,8
TAAA	4	1,6	TAAGG	2	0,8	AAGAAA	2	0,8
TCAA	3	1,2	TAAGA	2	0,8	AACTAA	2	0,8
GTAA	3	1,2	TAAAT	2	0,8	AAATTA	2	0,8
GAAT	3	1,2	TAAAG	2	0,8	TTTTGA	1	0,4
CTCA	3	1,2	GACTC	2	0,8	TTTTAT	1	0,4
CATG	3	1,2	CTCAC	2	0,8	TTTGAC	1	0,4
CATA	3	1,2	CATAA	2	0,8	TTTCCT	1	0,4
CACA	3	1,2	CACAA	2	0,8	TTTATT	1	0,4
ATGT	3	1,2	CAACT	2	0,8	TTTATA	1	0,4
ATCA	3	1,2	ATTGT	2	0,8	TTGTGG	1	0,4

BCU IAȘI - CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Tabel 100. Tetrameri, pentameri şi hexameri cu frecvenţe scăzute

Tetrameri cu frecvenţă mică			Pentameri cu frecvenţă mică			Hexameri cu frecvenţă mică		
Tetrameri	Număr	Frecvenţa (%)	Pentameri	Număr	Frecvenţa (%)	Hexameri	Număr	Frecvenţa (%)
AACA	1	0,4	AAACA	1	0,4	AAACAT	1	0,4
AACC	1	0,4	AAACC	1	0,4	AAACCA	1	0,4
AAGC	1	0,4	AAAGC	1	0,4	AAAGCA	1	0,4
AAGT	1	0,4	AAAGG	1	0,4	AAAGGA	1	0,4
ACCC	1	0,4	AACAT	1	0,4	AAATTG	1	0,4
ACTG	1	0,4	AACCA	1	0,4	AACATA	1	0,4
AGAC	1	0,4	AAGAC	1	0,4	AACCAC	1	0,4
AGCA	1	0,4	AAGCA	1	0,4	AACTAT	1	0,4
AGGA	1	0,4	AAGGA	1	0,4	AAGACT	1	0,4
AGGG	1	0,4	AAGTT	1	0,4	AAGCAT	1	0,4
AGTA	1	0,4	AATCA	1	0,4	AAGGAA	1	0,4
AGTT	1	0,4	AATCT	1	0,4	AAGGTA	1	0,4
ATAC	1	0,4	AATGA	1	0,4	AAGGTT	1	0,4
ATAG	1	0,4	AATTT	1	0,4	AAGTTA	1	0,4
ATGC	1	0,4	ACAAG	1	0,4	AATATA	1	0,4
CAAA	1	0,4	ACAAT	1	0,4	AATATC	1	0,4
CACC	1	0,4	ACATG	1	0,4	AATCAG	1	0,4
CAGG	1	0,4	ACCAA	1	0,4	AATCTT	1	0,4
CCAC	1	0,4	ACCAC	1	0,4	AATGAC	1	0,4
CCCA	1	0,4	ACCCG	1	0,4	AATGTA	1	0,4

5.9.1.2. Modelarea structurii secundare a ARNm

Utilizând modulul GeneQuest al programului DNA Star, a fost modelată structura secundară a ARNm (Figura 105), pe baza unei energii minime de –28,13.

Din figura 105 şi Anexa 13, se constată existenţa a 32 regiuni monocatenare, alternând cu 15 regiuni bicatenare.

Deoarece d-loop are importanţă doar în iniţierea replicării ADN mitocondrial, nefiind o secvenţă informativă, înseamnă că nu deţine informaţie care să fie translată în aminoacizi; de aceea, nu am realizat o caracterizare a catenei polipeptidice a acestei secvenţe.

BCU IAŞI - BIBLIOTECA UNIVERSITARĂ

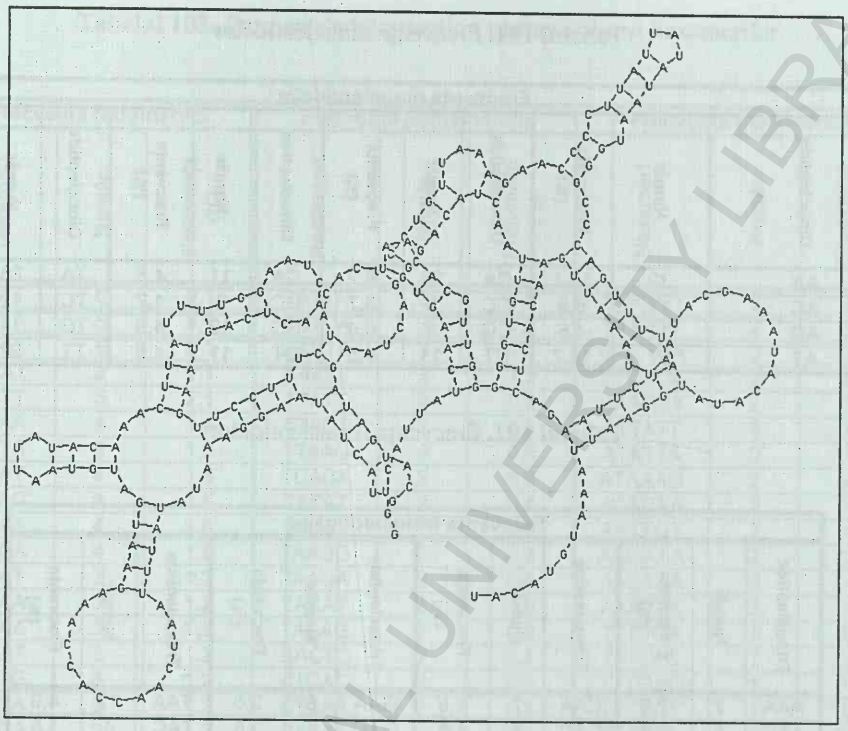


Figura 105. Modelarea structurii secundare a ARNm pentru haplotipul CagIMD al regiunii de control mitocondrial, la specia *Carassius gibelio Bloch.*

5.9.2. CARACTERIZAREA HAPLOTIPULUI CAG25ID

5.9.2.1. Frecvenţa tipurilor de asocieri nucleotidice

În acest haplotip se încadrează două secvenţe Cag02I şi Cag05I din populaţia Iaşi. În plus, se poate constata că mutaţia apărută în populaţiile studiate, datorită frecvenţei cu care apare, este în curs de a fi fixată în genofondul acestora.

Pentru caracterizarea haplotipului, au fost calculate frecvenţele dinucleotidelor (Tabelul 101), trinucleotidelor (Tabelul 102), tetramerilor, pentamerilor şi hexamerilor (Tabelul 103), precum şi tetramerii, pentamerii şi hexamerii cu frecvenţă scăzută (Tabelul 104).

BCU "CAROL I" CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Tabelul 101. Frecvența dinucleotidelor

Frecvența dinucleotidelor											
Dinucleotide	Număr	Frecvența (%)	Dinucleotide	Număr	Frecvența (%)	Dinucleotide	Număr	Frecvența (%)	Dinucleotide	Număr	Frecvența (%)
AA	32	13.1	CA	20	8.2	GA	11	4,5	TA	28	11,4
AC	17	6.9	CC	9	3,7	GC	3	1,2	TC	12	4,9
AG	11	4.5	CG	1	0,4	GG	12	4,9	TG	14	5,7
AT	31	12.7	CT	11	4,5	GT	11	4,5	TT	22	9,0

Tabelul 102. Frecvența trinucleotidelor

Frecvența trinucleotidelor											
Trinucleotide	Număr	Frecvența (%)	Trinucleotide	Număr	Frecvența (%)	Trinucleotide	Număr	Frecvența (%)	Trinucleotide	Număr	Frecvența (%)
AAA	7	2,9	CAA	7	2,9	GAA	6	2,5	TAA	12	4,9
AAC	5	2,0	CAC	4	1,6	GAC	4	1,6	TAC	4	1,6
AAG	8	3,3	CAG	1	0,4	GAG	0	0,0	TAG	2	0,8
AAT	12	4,9	CAT	8	3,3	GAT	1	0,4	TAT	10	4,1
ACA	7	2,9	CCA	3	1,2	GCA	3	1,2	TCA	7	2,9
ACC	3	1,2	CCC	3	1,2	GCC	0	0,0	TCC	3	1,2
ACG	0	0,0	CCG	1	0,4	GCG	0	0,0	TCG	0	0,0
ACT	7	2,9	CCT	2	0,8	GCT	0	0,0	TCT	2	0,8
AGA	4	1,6	CGA	0	0,0	GGA	2	0,8	TGA	5	2,0
AGC	1	0,4	CGC	0	0,0	GGC	0	0,0	TGC	2	0,8
AGG	4	1,6	CGG	1	0,4	GGG	5	2,0	TGG	2	0,8
AGT	2	0,8	CGT	0	0,0	GGT	4	1,6	TGT	5	2,0
ATA	10	4,1	CTA	3	1,2	GTA	5	2,0	TTA	9	3,7
ATC	5	2,0	CTC	4	1,6	GTC	1	0,4	TTC	2	0,8
ATG	6	2,5	CTG	1	0,4	GTG	2	0,8	TTG	5	2,0
ATT	10	4,1	CTT	3	1,2	GTT	3	1,2	TTT	6	2,5

BCU IASI

Tabelul 103. Frecvențele tetramerilor, pentamerilor și hexamerilor

Frecvența tetramerilor			Frecvența pentamerilor			Frecvența hexamerilor		
Tetrameri	Număr	Frecvența (%)	Pentameri	Număr	Frecvența (%)	Hexameri	Număr	Frecvența (%)
TATT	5	2,1	TATTA	3	1,2	TAAGGT	2	0,8
ATTA	5	2,1	ACTCA	3	1,2	TAAATT	2	0,8
ATAT	5	2,1	AACTA	3	1,2	GACTCA	2	0,8
ACAT	5	2,1	AAATT	3	1,2	CTCACA	2	0,8
AATT	5	2,1	TTATT	2	0,8	CAACTA	2	0,8
TTAA	4	1,6	TTACT	2	0,8	ATTATT	2	0,8
TATA	4	1,6	TTAAG	2	0,8	ATATTA	2	0,8
TAAT	4	1,6	TCACA	2	0,8	ATAAAG	2	0,8
TAAG	4	1,6	TATAT	2	0,8	ACTCAA	2	0,8
TAAA	4	1,6	TACAT	2	0,8	AATTGT	2	0,8
CTCA	4	1,6	TAAGG	2	0,8	AAGAAA	2	0,8
TTAT	3	1,2	TAAGA	2	0,8	AACTAA	2	0,8
TCAA	3	1,2	TAAAT	2	0,8	AAATTA	2	0,8
GTAA	3	1,2	TAAAG	2	0,8	TTTTGA	1	0,4
GAAT	3	1,2	GACTC	2	0,8	TTTTAC	1	0,4
CATG	3	1,2	CTCAC	2	0,8	TTTGAC	1	0,4
CATA	3	1,2	CTCAA	2	0,8	TTTCCT	1	0,4
CACA	3	1,2	CATAA	2	0,8	TTTATA	1	0,4
ATGT	3	1,2	CACAA	2	0,8	TTTACT	1	0,4
ATCA	3	1,2	CAACT	2	0,8	TTGTGG	1	0,4

Tabelul 104. Tetrameri, pentameri și hexameri cu frecvențe scăzute

Tetrameri cu frecvență mică			Pentameri cu frecvență mică			Hexameri cu frecvență mică		
Tetrameri	Număr	Frecvența (%)	Pentameri	Număr	Frecvența (%)	Hexameri	Număr	Frecvența (%)
AACA	1	0,4	AAACA	1	0,4	AAACAT	1	0,4
AACC	1	0,4	AAACC	1	0,4	AAACCA	1	0,4
AAGC	1	0,4	AAAGC	1	0,4	AAAGCA	1	0,4
AAGT	1	0,4	AAAGG	1	0,4	AAAGGA	1	0,4
ACCC	1	0,4	AACAT	1	0,4	AAATTG	1	0,4
ACTG	1	0,4	AACCA	1	0,4	AACATA	1	0,4
AGAC	1	0,4	AAGAC	1	0,4	AACCAC	1	0,4
AGCA	1	0,4	AAGCA	1	0,4	AACTAT	1	0,4
AGGA	1	0,4	AAGGA	1	0,4	AAGACT	1	0,4

BIBLIOTECA CENTRALĂ UNIVERSITARY LIBRARY

AGGG	1	0,4	AAGTT	1	0,4	AAGCAT	1	0,4
AGTA	1	0,4	AATCA	1	0,4	AAGGAA	1	0,4
AGTT	1	0,4	AATCT	1	0,4	AAGGTA	1	0,4
ATAC	1	0,4	AATGA	1	0,4	AAGGTT	1	0,4
ATAG	1	0,4	AATTT	1	0,4	AAGTTA	1	0,4
ATGT	1	0,4	ACAAG	1	0,4	AATATA	1	0,4
ATTC	1	0,4	ACAAT	1	0,4	AATATC	1	0,4
CAAA	1	0,4	ACATG	1	0,4	AATCAG	1	0,4
CACC	1	0,4	ACCAA	1	0,4	AATCTT	1	0,4
CAGG	1	0,4	ACCAC	1	0,4	AATGAC	1	0,4
CCAC	1	0,4	ACCCG	1	0,4	AATGTA	1	0,4

Din tabelul 101 constatăm, referitor la procentele dinucleotidelor, că valoarea cea mai mare o are perechea AA (13,1%), iar valoarea cea mai mică perechea CG, în proporţie de 0,4%. Referitor la trinucleotide (Tabelul 102), cea mai mare frecvenţă o înregistrează tripletul AAT (4,9%), iar valoarea cea mai mică, tripletele AGC, CCG, CGG, CTG, GAT şi GTC, având o frecvenţă de 0,4%. În plus, se constată lipsa trimerilor ACG, CGA, CGC, CGT, GAG, GCC, GCG, GCT, GGC şi TCG.

Tetramerii cu frecvenţa cea mai mare sunt TATT, ATTA, ATAT, ACAT şi AATT, (2,1%), iar cei cu frecvenţa cea mai mică se găsesc în procent de 1,2%. În cazul pentamerilor (Tabelul 103), cea mai mare frecvenţă o au pentamerii TATTA, ACTCA, AACTA şi AAATT (1,2%), iar toţi ceilalţi au frecvenţe foarte mici (0,8%). În ceea ce priveşte hexamerii, aceştia au frecvenţe cuprinse între 0,8% şi 0,4%.

Tetramerii, pentamerii şi hexamerii cu frecvenţă scăzută (Tabelul 104) sunt cei care se găsesc într-un singur exemplar în întreaga genă, având o frecvenţă de 0,4%.

Cu ajutorul modulului EditSeq al DNA Star, a fost calculată temperatura de topire a ADN, după un model Davis-Botstein-Roth; în acest caz, prezintă o valoare de 76,03°C.

5.9.2.2. Modelarea structurii secundare a ARNm

Modelarea structurii secundare a ARNm (Figura 106) s-a realizat pe baza unei energii minime de –28,89.

Din figura 106 şi Anexa 14, se constată că structura secundară a ARNm prezintă 25 porţiuni monocatenare şi 16 regiuni bicatenare.

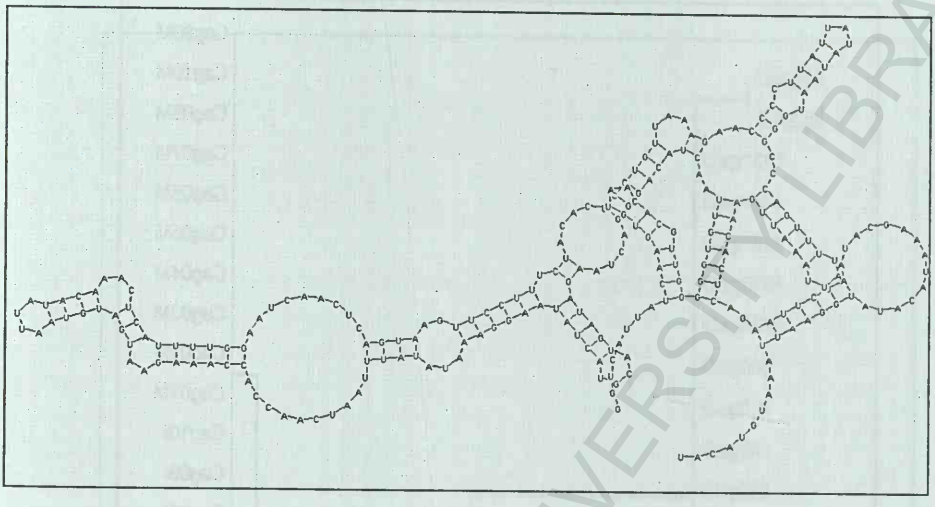


Figura 106. Modelarea structurii secundare a ARNm pentru haplotipul Cag25ID al regiunii de control mitocondrial, la specia *Carassius gibelio* Bloch

5.9.3. RELAŢII FILOGENETICE ÎN CADRUL GENULUI CARASSIUS, *BAZATE PE DIFERENŢE ALE SECVENŢELOR REGIUNII DE CONTROL MITOCONDRIAL*

Ca şi în cazul citocromului b, au fost utilizate metode care se bazează pe distanţe şi rata de substituţie, dar care implică şi mutaţii de genul tranziţiilor şi transversiilor. Astfel, şi în acest caz au fost utilizate UPGMA (Figura 107) pe baza unui model Tamura-Nei, metoda evoluţiei minime (ME), după un algoritm Neighbor-Joining (Figura 108) şi Maximum Parsimony (Figura 109).

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

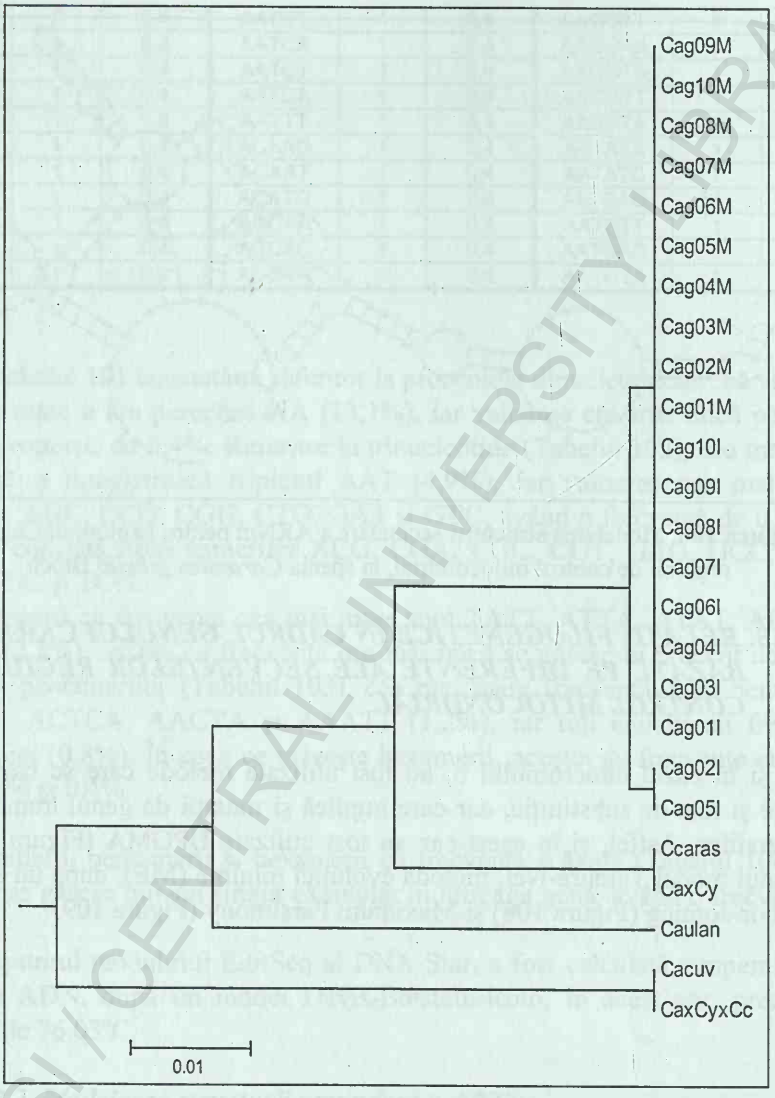


Figura 107. Arbore filogenetic rectangular al genului *Carassius*, realizat prin metoda UPGMA pe baza secvențelor d-loop

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

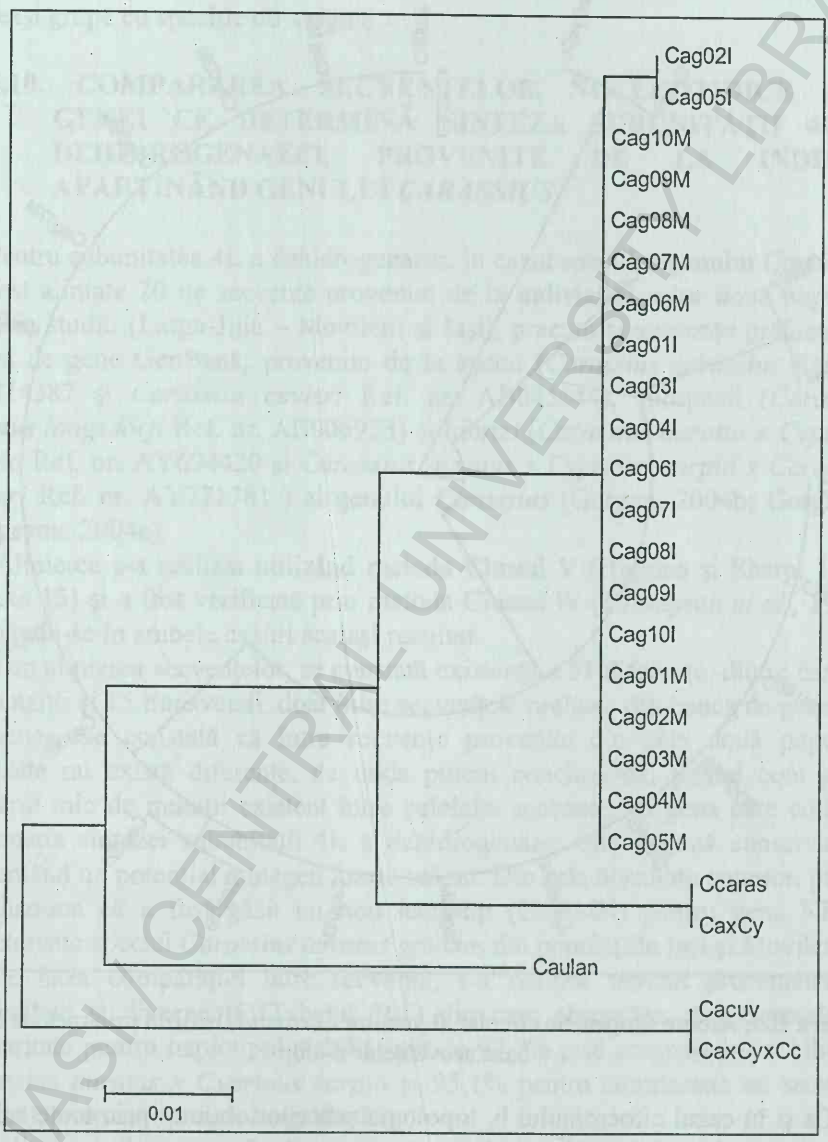


Figura 108. Arbore filogenetic rectangular al genului *Carassius*, realizat prin metoda ME pe baza secvențelor d-loop

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

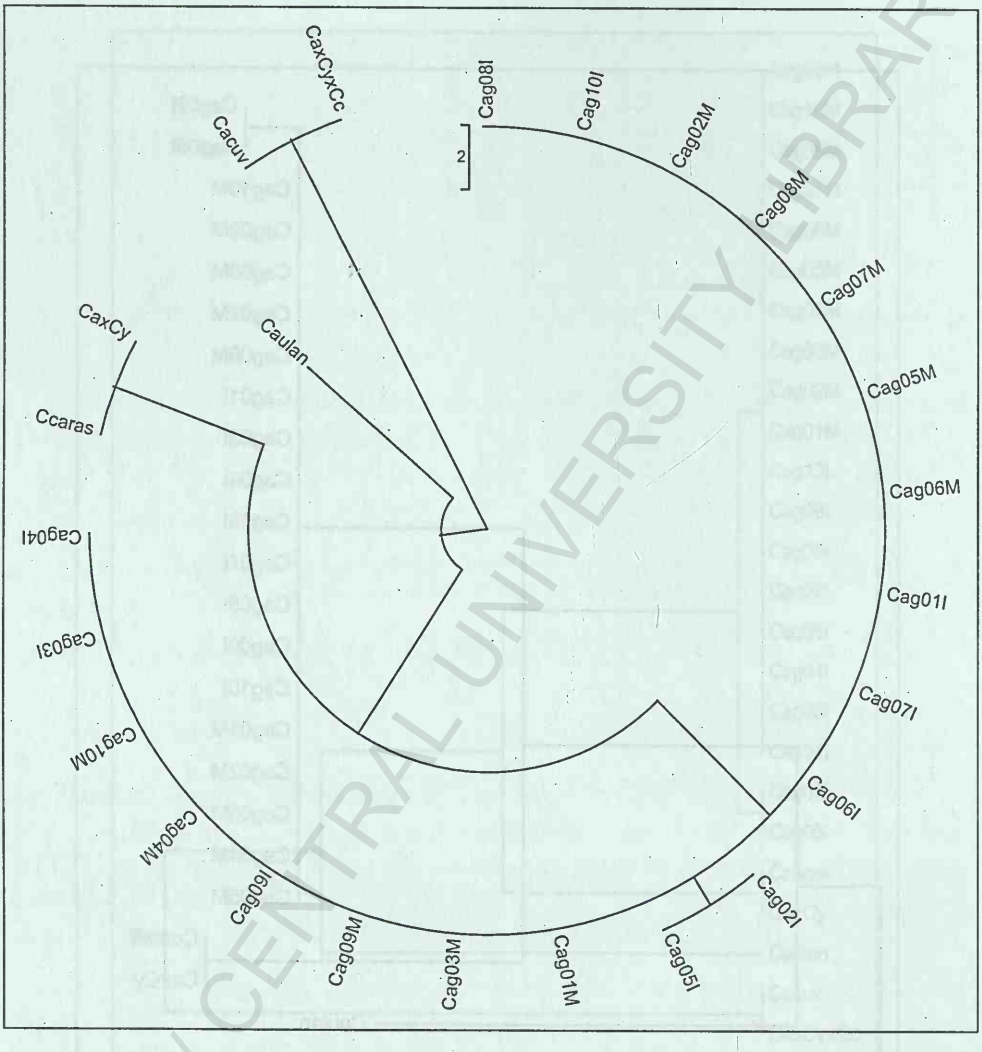


Figura 109. Arbore filogenetic circular al genului *Carassius*, realizat prin metoda MP pe baza secvențelor d-loop

Ca şi în cazul citocromului b, topologia arborilor obținuți prin toate cele trei metode este identică, evidențiind gruparea taxonilor în categorii de similaritate, precum şi treapta evolutivă a fiecărui grup. Astfel, se observă că specia *Carassius auratus langsdörfi* provine din aceeaşi specie de origine ca şi *Carassius cuvieri*, precum şi grupul din care au derivat speciile *Carassius*

BCU IAŞI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

carassius şi *Carassius gibelio*. De asemenea, se observă că hibrizii sunt situaţi în aceleaşi grupe cu speciile de origine.

5.10. COMPARAREA SECVENŢELOR NUCLEOTIDICE ALE GENEI CE DETERMINĂ SINTEZA SUBUNITĂŢII 4L A DEHIDROGENAZEI, PROVENITE DE LA INDIVIZI APARŢINÂND GENULUI *CARASSIUS*

Pentru subunitatea 4L a dehidrogenazei, în cazul speciilor genului *Carassius*, au fost aliniate 20 de secvenţe provenite de la indivizi ai celor două populaţii luate în studiu (Larga-Jijia – Movileni şi Iaşi), precum şi secvenţe preluate din banca de gene GenBank, provenite de la specii (*Carassius carassius* Ref. nr. AY714387 şi *Carassius cuvieri* Ref. nr. AB045144), subspecii (*Carassius auratus langsdörfi* Ref. nr. AB006953) şi hibrizi (*Carassius auratus x Cyprinus carpio* Ref. nr. AY694420 şi *Carassius auratus x Cyprinus carpio x Carassius cuvieri* Ref. nr. AY771781) ai genului *Carassius* (Gorgan, 2004b; Gorgan şi Cîmpeanu, 2004e).

Alinierea s-a realizat utilizând metoda Clustal V (Higgins şi Sharp, 1989) (Anexa 15) şi a fost verificată prin metoda Clustal W (Thompson *et al.*, 1994), obţinându-se în ambele cazuri acelaşi rezultat.

Din alinierea secvenţelor, se constată existenţa a 51 diferenţe, dintre care 36 de tranziţii şi 15 transversii, doar între secvenţele preluate din banca de gene. De asemenea, se constată că între secvenţe provenite din cele două populaţii analizate nu există diferenţe, de unde putem concluziona, ţinând cont şi de numărul mic de mutaţii existent între celelalte secvenţe, că gena care codifică informaţia sintezei subunităţii 4L a dehidrogenazei este o genă conservativă, prezentând un potenţial mutagen foarte scăzut. Din cele discutate anterior, putem concluziona că a fost găsit un nou haplotip (CagIMN) pentru gena ND4L, caracteristic speciei *Carassius auratus gibelio*, din populaţiile Iaşi şi Movileni.

Pe baza comparaţiei între secvenţe, s-a realizat tabelul procentelor de similaritate şi divergenţă (Tabelul 105) din care observăm că procentele de similaritate pentru haplotipul stabilit sunt de 97,7% prin comparaţia cu hibridul *Carassius auratus x Cyprinus carpio* şi 95,1% pentru comparaţia cu secvenţa speciei *Carassius auratus langsdörfi*.

BCU IAŞI - BIBLIOTECA UNIVERSITARĂ LIBRARY

Tabel 105. Procentele de similaritate şi divergenţă pentru secvenţele haplotipurilor stabilite

Procent de divergenţă	Procent de similaritate							
		CagI MN	Cac uv	Caul an	Cax Cy	Cax Cyx Ccu v	Ccara s	
	CagIMN		93,5	95,1	97,7	97,0	97,3	CagIMN
	Cacuv	6,8		93,5	93,9	94,7	94,3	Cacuv
	Caulan	5,2	6,9		97,3	95,8	97,0	Caulan
	CaxCy	2,3	6,5	2,7		98,5	99,6	CaxCy
	CaxCyxC cuv	3,1	5,6	4,4	1,5		98,9	CaxCyx Ccuv
	Ccaras	2,7	6,1	3,1	0,4	1,2		Ccaras
		CagI MN	Cac uv	Caul an	Cax Cy	Cax Cyx Ccu v	Ccara s	

În plus, pentru a stabili o mai clară diferenţiere între toate noile haplotipuri, au fost analizate numărul şi procentele în care se găsesc bazele azotate în fiecare dintre acestea (Tabel 106).

Tabel 106. Procentul bazelor azotate în cadrul haplotipurilor stabilite

Baze azotate		Specii analizate					
		CagIMN	Ccaras	Ccuv	Caulan	CaxCy	CaxCyxCcuv
A	Nr.	64	59	57	59	60	59
	%	24,52	22,61	21,84	22,61	22,99	22,61
G	Nr.	43	45	47	45	44	45
	%	16,48	17,24	18,01	17,24	16,86	17,24
T	Nr.	78	80	79	78	80	81
	%	29,89	30,65	30,27	29,89	30,65	31,03
C	Nr.	76	77	78	79	77	16
	%	29,12	29,50	29,89	30,27	29,50	29,12
A+T	Nr.	142	139	136	137	140	140
	%	54,41	53,26	52,11	52,49	53,64	53,64
C+G	Nr.	119	122	125	124	121	121
	%	45,59	46,74	47,09	47,51	46,36	46,36

BCU CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

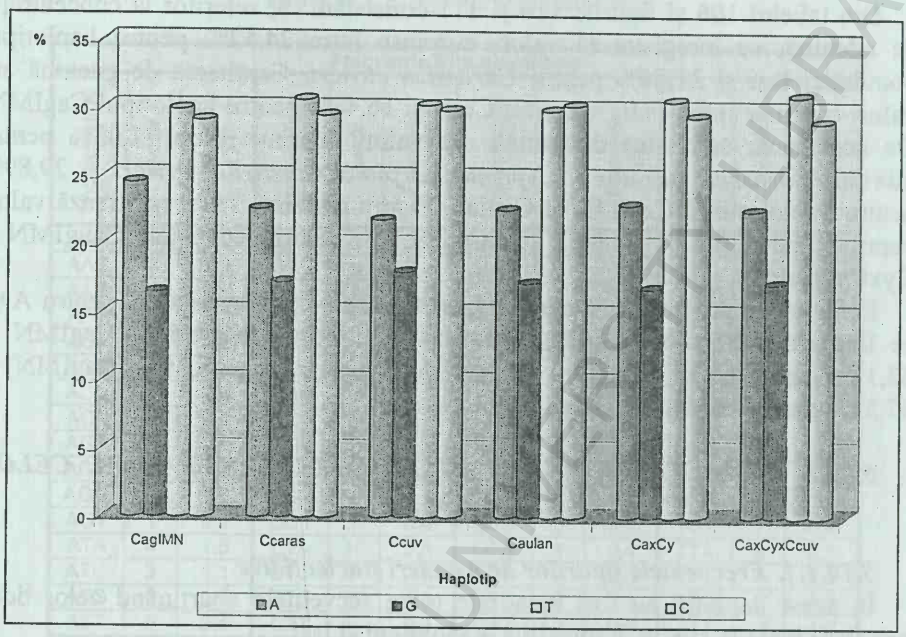


Figura 110. Graficul frecvenței bazelor azotate în cadrul haplotipurilor caracterizate

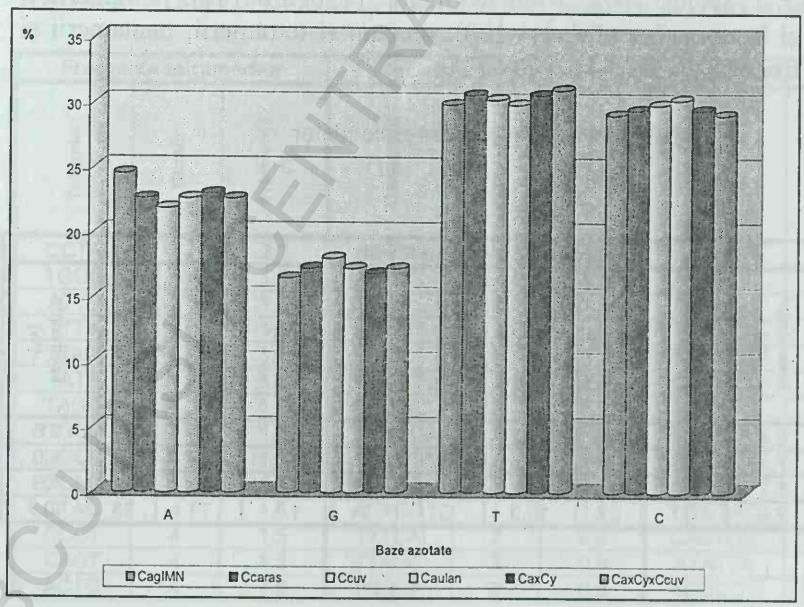


Figura 111. Graficul comparativ al frecvenței bazelor azotate, pentru haplotipurile analizate

BCU "LUCIAN BLAGA" CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Din tabelul 106 şi figurile 110 şi 111 constatăm că, referitor la concentraţia de adenină, se înregistrează valori cuprinse între 24,52% pentru haplotipul populaţiei Iaşi şi 21,84% pentru *Carassius cuvieri*. Cantitatea de guanină are valori cuprinse între 18,01% pentru Ccuv şi 16,48% pentru haplotipul CagIMN. De asemenea, cantitatea de timină are valori cuprinse între 31,03% pentru hibridul *Carassius auratus x Cyprinus carpio x Carassius cuvieri* şi 29,89% pentru haplotipurile CagIMN şi Caulan. Pentru citozină, se înregistrează valori cuprinse între 30,27% pentru Caulan şi 29,12% pentru secvenţele CaugIMN şi CyxCyxCcuv.

Referitor la procentele în care se găsesc bazele complementare, pentru A+T se înregistrează valori cuprinse între 54,41% pentru haplotipul CagIMN şi 52,11% pentru Ccuv, iar pentru C+G, valori cuprinse între 45,59% (CagIMN) şi 47,51% pentru secvenţa Caulan.

5.10.1. CARACTERIZAREA HAPLOTIPULUI GENERAL AL CELOR DOUĂ POPULAŢII (CAGIMN)

5.10.1.1. Frecvenţele tipurilor de asocieri nucleotidice

În acest haplotip au fost încadrate toate secvenţele aparţinând celor două populaţii luate în studiu, Larga-Jijia – Movileni şi Iaşi.

Pentru a caracteriza acest haplotip, au fost calculate frecvenţele dinucleotidelor (Tabelul 107), trinucleotidelor (Tabelul 108), tetramerilor, pentamerilor şi hexamerilor (Tabelul 109), precum şi tetramerii, pentamerii şi hexamerii cu frecvenţă scăzută (Tabelul 110).

Tabel 107. Frecvenţa dinucleotidelor

Frecvenţa dinucleotidelor											
Dinucleotide	Număr	Frecvenţa (%)	Dinucleotide	Număr	Frecvenţa (%)	Dinucleotide	Număr	Frecvenţa (%)	Dinucleotide	Număr	Frecvenţa (%)
AA	9	3,4	CA	21	8,0	GA	11	4,2	TA	23	8,8
AC	20	7,6	CC	23	8,8	GC	20	7,6	TC	13	5,0
AG	15	5,7	CG	5	1,9	GG	10	3,8	TG	14	5,3
AT	20	7,6	CT	27	10,3	GT	3	1,1	TT	28	10,7

BCU IAŞI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Tabel 108. Frecvența trinucleotidelor

Frecvența trinucleotidelor											
Trinucleotide	Număr	Frecvența (%)	Trinucleotide	Număr	Frecvența (%)	Trinucleotide	Număr	Frecvența (%)	Trinucleotide	Număr	Frecvența (%)
AAA	0	0,0	CAA	2	0,8	GAA	5	1,9	TAA	2	0,8
AAC	2	0,8	CAC	9	3,4	GAC	3	1,1	TAC	6	2,3
AAG	2	0,8	CAG	4	1,5	GAG	1	0,4	TAG	8	3,1
AAT	5	1,9	CAT	6	2,3	GAT	1	0,4	TAT	7	2,7
ACA	8	3,1	CCA	3	1,1	GCA	6	2,3	TCA	4	1,5
ACC	4	1,5	CCC	9	3,4	GCC	8	3,1	TCC	2	0,8
ACG	0	0,0	CCG	3	1,1	GCG	1	0,4	TCG	1	0,4
ACT	8	3,1	CCT	8	3,1	GCT	5	1,9	TCT	6	2,3
AGA	2	0,8	CGA	2	0,8	GGA	4	1,5	TGA	3	1,1
AGC	8	3,1	CGC	1	0,4	GGC	6	2,3	TGC	5	1,9
AGG	4	1,5	CGG	1	0,4	GGG	0	0,0	TGG	5	1,9
AGT	1	0,4	CGT	1	0,4	GGT	0	0,0	TGT	1	0,4
ATA	4	1,5	CTA	10	3,8	GTA	1	0,4	TTA	8	3,1
ATC	3	1,1	CTC	6	2,3	GTC	0	0,0	TTC	4	1,5
ATG	4	1,5	CTG	5	1,9	GTG	0	0,0	TTG	5	1,9
ATT	9	3,4	CTT	6	2,3	GTT	2	0,8	TTT	11	4,2

Tabel 109. Frecvențele tetramerilor, pentamerilor și hexamerilor

Frecvența tetramerilor			Frecvența pentamerilor			Frecvența hexamerilor		
Tetrameri	Număr	Frecvența (%)	Pentameri	Număr	Frecvența (%)	Hexameri	Număr	Frecvența (%)
CCTA	7	2,7	CCCTA	4	1,5	GCCCTA	3	1,2
TGGC	5	1,9	TTTAG	3	1,2	ACTGGC	3	1,2
ATTT	5	1,9	TGGCC	3	1,2	TTTAGC	2	0,8
TTTA	4	1,5	GGCCT	3	1,2	TTAGCT	2	0,8
TTAG	4	1,5	GCCCT	3	1,2	TGGCCT	2	0,8
TATT	4	1,5	GCACT	3	1,2	GGCCTA	2	0,8
TAGC	4	1,5	CTGGC	3	1,2	GCACTG	2	0,8
GGCC	4	1,5	CCTAC	3	1,2	CTGGCC	2	0,8
GCCC	4	1,5	CACTG	3	1,2	CCTACT	2	0,8
GCAC	4	1,5	AGCCC	3	1,2	CCCTAT	2	0,8
CTAC	4	1,5	ACTGG	3	1,2	CCCTAC	2	0,8
CCCT	4	1,5	TTTCA	2	0,8	CACTGG	2	0,8
CACT	4	1,5	TTAGC	2	0,8	ATATTA	2	0,8
ACTG	4	1,5	TGGCA	2	0,8	AGCCCT	2	0,8

BUCHAREST CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

TTTT	3	1,2	TCTTA	2	0,8	TTTTGG	1	0,4
TTGC	3	1,2	TATTA	2	0,8	TTTTCA	1	0,4
TTCA	3	1,2	TAGCT	2	0,8	TTTTAG	1	0,4
TTAT	3	1,2	TAATA	2	0,8	TTTGGC	1	0,4
TACT	3	1,2	GCCTA	2	0,8	TTTGAA	1	0,4
TACA	3	1,2	GCATT	2	0,8	TTTCAC	1	0,4

Tabel 110. Tetrameri, pentameri şi hexameri cu frecvenţe scăzute

Tetrameri cu frecvenţă mică			Pentameri cu frecvenţă mică			Hexameri cu frecvenţă mică		
Tetrameri	Număr	Frecvenţa (%)	Pentameri	Număr	Frecvenţa (%)	Hexameri	Număr	Frecvenţa (%)
AAGC	1	0,4	AACAC	1	0,4	AACACA	1	0,4
AAGG	1	0,4	AACAG	1	0,4	AACAGC	1	0,4
AATC	1	0,4	AAGCT	1	0,4	AAGCTA	1	0,4
AATT	1	0,4	AAGGA	1	0,4	AAGGAA	1	0,4
ACAA	1	0,4	AATAA	1	0,4	AATAAT	1	0,4
ACCG	1	0,4	AATAG	1	0,4	AATAGG	1	0,4
ACCT	1	0,4	AATAT	1	0,4	AATATT	1	0,4
ACTA	1	0,4	AATCT	1	0,4	AATCTA	1	0,4
ACTT	1	0,4	AATTT	1	0,4	AATTTG	1	0,4
AGAA	1	0,4	ACAAT	1	0,4	ACAATT	1	0,4
AGGC	1	0,4	ACACA	1	0,4	ACACAT	1	0,4
AGTT	1	0,4	ACACC	1	0,4	ACACCC	1	0,4
ATAA	1	0,4	ACAGA	1	0,4	ACAGCC	1	0,4
ATAG	1	0,4	ACAGC	1	0,4	ACAGGA	1	0,4
ATCC	1	0,4	ACAGG	1	0,4	ACATGG	1	0,4
ATGG	1	0,4	ACATG	1	0,4	ACATTT	1	0,4
ATGT	1	0,4	ACATT	1	0,4	ACCCAC	1	0,4
ATTC	1	0,4	ACCCA	1	0,4	ACCCGT	1	0,4
ATTG	1	0,4	ACCCG	1	0,4	ACCGGA	1	0,4
CAAC	1	0,4	ACCGG	1	0,4	ACCTAC	1	0,4

Din tabelul 107 constatăm, referitor la procentele dinucleotidelor, că valoarea cea mai mare o are perechea TT (10,7%), iar valoarea cea mai mică perechea GT, în proporţie de 1,1%. Referitor la trinucleotide (Tabelul 108), cea mai mare frecvenţă o înregistrează tripletul TTT (4,2%), iar valoarea cea mai mică, tripletele AGT, CGC, CGG, CGT, GAG, GAT, GCG, GTA, TCG şi TGT, având o frecvenţă de 0,4%. Se constată că există şi trinucleotide lipsă: AAA, ACG, GGG, GGT, GTC şi GTG.

Tetramerul cu frecvenţa cea mai mare este CCTA (2,7%), iar cei cu frecvenţa cea mai mică: TTTT, TTGC, TTCA, TTAT, TACT şi TACA, toţi în procent de

1,2%. În cazul pentamerilor (Tabelul 109), cea mai mare frecvenţă o are pentamerul CCCTA (1,5%), iar restul au valori de 1,2% – 0,8%. În ceea ce priveşte hexamerii, aceştia au frecvenţe cuprinse între 1,2% şi 0,4%.

Tetramerii, pentamerii şi hexamerii cu frecvenţă scăzută sunt cei care se găsesc într-un singur exemplar în întreaga genă, având o frecvenţă de 0,4% (Tabelul 110).

Cu ajutorul modulului EditSeq al DNA Star, a fost calculată temperatura de topire a ADN, după un model Davis-Botstein-Roth; în acest caz, prezintă o valoare de 81,68°C.

5.10.1.2. Modelarea structurii secundare a ARNm

Utilizând modulul GeneQuest al programului DNA Star, a fost modelată structura ARN (Figura 230), pe baza unei energii minime de –31,46.
Din figura 112 şi Anexa 16, se observă că ARNm prezintă în structura secundară, 27 regiuni monocatenare, alternând cu 15 regiuni bicatenare.

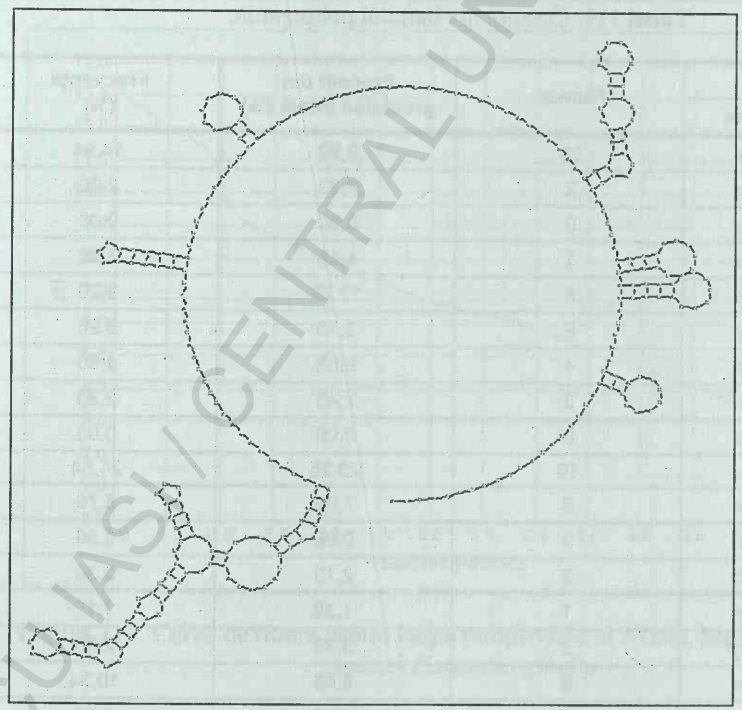


Figura 112. Modelarea structurii secundare a ARNm pentru haplotipul CagIMN al ND4L, la specia *Carassius gibelio* Bloch.

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

5.10.1.3. Translaţia şi caracterizarea catenei

Translaţia s-a realizat pe baza unui cod genetic mitocondrial pentru vertebrate, utilizând modulul EditSeq din cadrul programului DNA Star.

Catena polipeptidică obţinută este prezentată în figura 113.

```
MTPVHFSFSS AFILGLMGLA FHRTHLLSAL LCLEGMMLSL FIALALWALQ
FESTGFSTAP MLLLAFSACE ASTGLALLVA TARTHGT
```

Figura 113. Catena polipeptidică a ND4L caracteristică haplotipului CagIMN al speciei *Carassius gibelio*

După realizarea translaţiei, se constată că întreg lanţul polipeptidic este alcătuit din 87 aminoacizi (Tabelul 111), din care se observă că frecvenţa cea mai mare o are leucina (24,84%), iar cea mai scăzută o au acidul glutamic şi triptofanul (1,15%).

Tabel 111. Compoziţia lanţului polipeptidic

Aminoacizi		Număr	Procent din greutatea totală (%)	Frecvenţa (%)
Simbol	Nume			
A	Ala	13	9,99	14,94
C	Cys	2	2,23	2,30
D	Asp	0	0,00	0,00
E	Glu	3	4,19	3,45
F	Phe	8	12,73	9,20
G	Gly	6	3,70	6,90
H	His	4	5,93	4,60
I	Ile	2	2,45	2,30
K	Lys	0	0,00	0,00
L	Leu	19	23,25	21,84
M	Met	5	7,09	5,75
N	Asn	0	0,00	0,00
P	Pro	2	2,10	2,30
Q	Gln	1	1,39	1,15
R	Arg	2	3,38	2,30
S	Ser	9	8,48	10,34
T	Thr	8	8,75	9,20
V	Val	2	2,14	2,30

BCU IAŞI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

W	Trp	1	2,01	1,15
Y	Tyr	0	0,00	0,00
B	Asx	0	0,00	0,00
Z	Glx	0	0,00	0,00
.	Ter	0	0,00	0,00

Se constată că din totalul de 87 aminoacizi, 3 sunt acizi, 2 sunt bazici, 20 polari şi 45 hidrofobi (Tabelul 112). De asemenea, se constată că lanţul polipeptidic are o sarcină electrică de –0,48 (la pH=7) şi un punct izoelectric de 6,74 (Figura 114).

Tabel 112. Caracterizarea lanţului polipeptidic

Greutate moleculară (Daltoni)	Număr de aminoacizi	Aminoacizi				Punct izoelectric	Sarcina electrică la pH=7	Concentraţia la o extincţie =1 şi λ=280nm
		Puternic bazici	Puternic acizi	Hidrofobi	Polari			
9247,07	87	2	3	45	20	6,736	-0,479	1,56

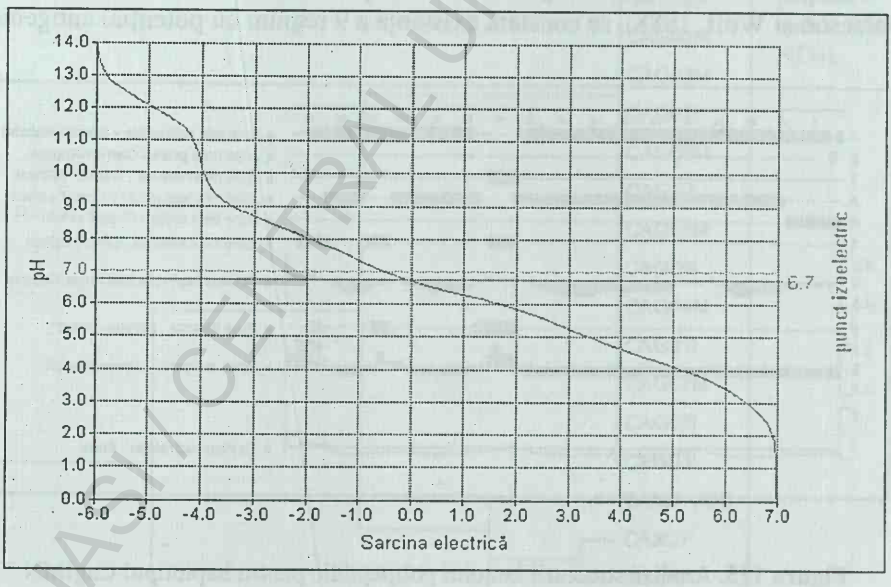


Figura 114. Curba de titrare pentru lanţul polipeptidic al ND4L, haplotip CagIMN al speciei *Carassius gibelio*

BCU IAŞI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Ulterior, a fost realizată o analiză a structurii proteinei (Figura 115); astfel, au fost determinate zonele alfa helicoidale, beta pliate şi de inflexiune, prin două metode Garnier-Robson (Garnier *et al.*, 1978) şi Chou-Fasman (Chou şi Fasman, 1978); reprezentarea grafică a zonelor hidrofobe (Kyte şi Doolittle, 1982), zonele de flexie (Karplus şi Schultz, 1985), indexul antigenic (Jameson şi Wolf, 1988) şi graficul probabil al suprafeţei (Emini *et al.*, 1985).

Din analiza structurii lanţului polipeptidic se poate observa, referitor la regiunile alfa helicoidale, că pentru ambele metode sunt date ca fiind 2 astfel de zone. De asemenea, pentru regiunile beta pliate, se constată existenţa unei singure regiuni, în cazul ambelor metode. Referitor la zonele de inflexiune, comparativ pentru cele două metode, se constată că pentru prima metodă (Garnier-Robson), sunt prezentate 2 regiuni, iar prin a doua metodă (Chou-Fasman), sunt date 3 astfel de regiuni.

Pe baza graficului hidrofobicităţii, realizat după un model Kyte-Doolitle (Kyte şi Doolittle, 1982), se constată că există 6 zone hidrofobe şi 4 zone hidrofile.

Din graficul indexului antigenic, calculat pe baza modelului Jameson-Wolf (Jameson şi Wolf, 1988), se constată existenţa a 9 regiuni cu potenţial antigenic.

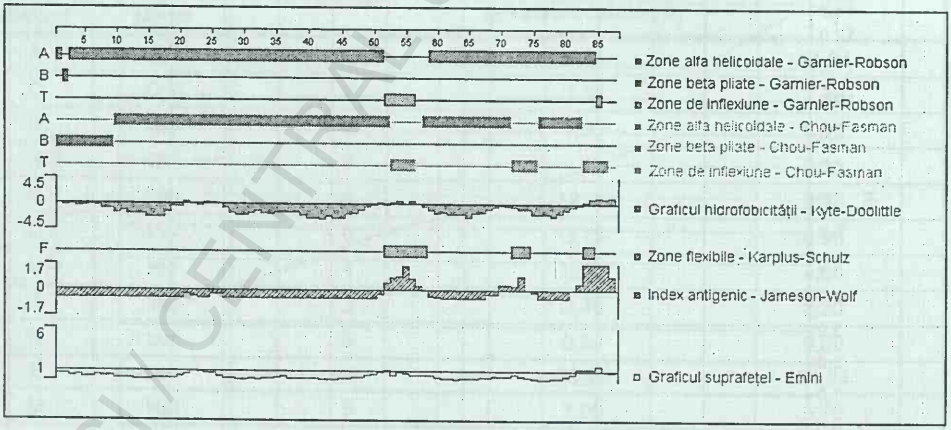


Figura 115. Analiza structurii lanţului polipeptidic pentru haplotipul CagIMN

BCU IAŞI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

5.10.2. RELAȚII FILOGENETICE ÎN CADRUL GENULUI CARASSIUS, *BAZATE PE DIFERENȚE ALE SECVENȚELOR GENEI CE DETERMINĂ SINTEZA ND4L*

În acest caz, arborii filogenetici au fost realizați utilizând aceleași metode: UPGMA, pe baza modelului Tamura-Nei (Figura 116), Minimum Evolution, pe baza unui algoritm Neighbor-Joining (Figura 117), și Maximum Parsimony (Figura 118).

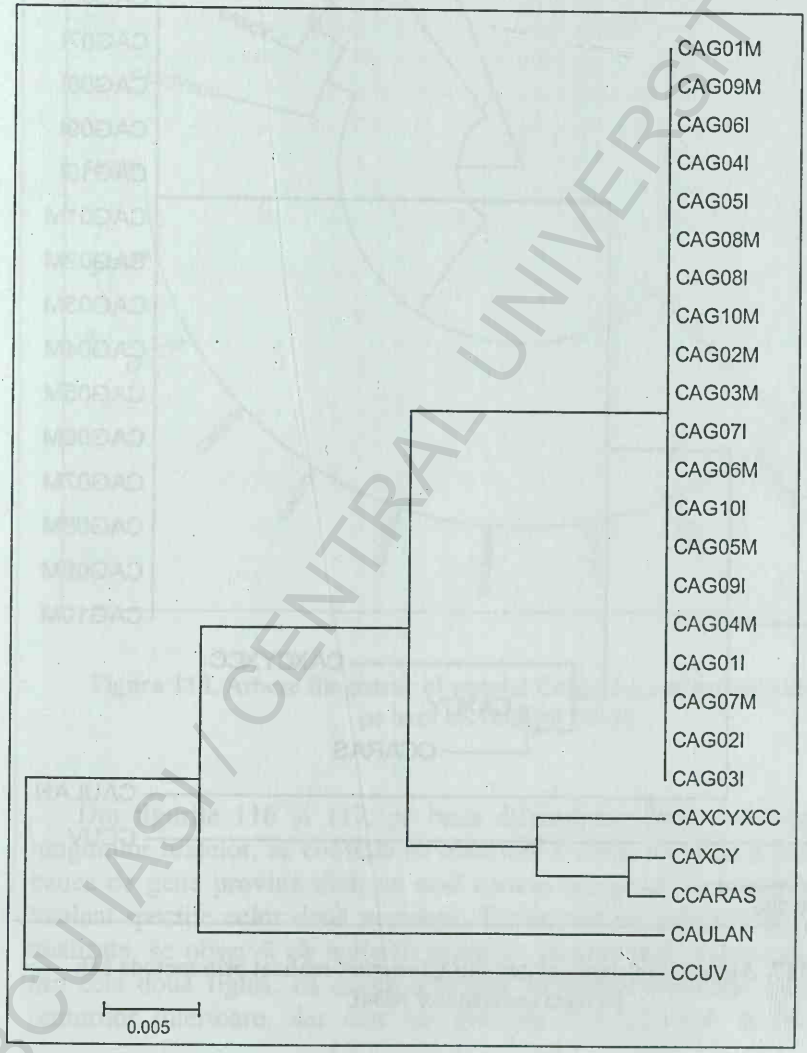


Figura 116. Arbore filogenetic al genului *Carassius*, realizat prin metoda UPGMA pe baza secvențelor ND4L

BCU IAȘI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

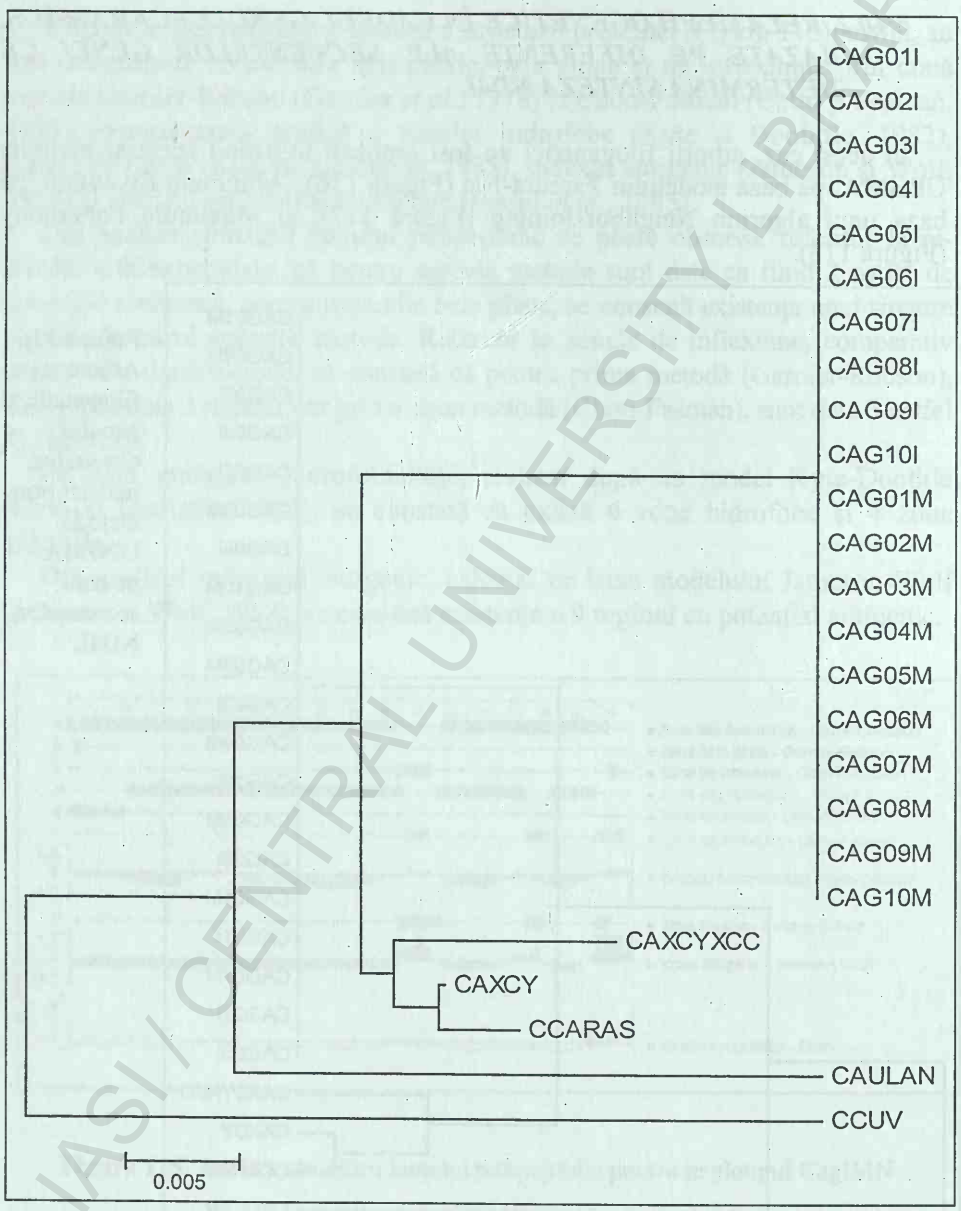


Figura 117. Arbore filogenetic al genului *Carassius*, realizat prin metoda ME pe baza secvențelor ND4L

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

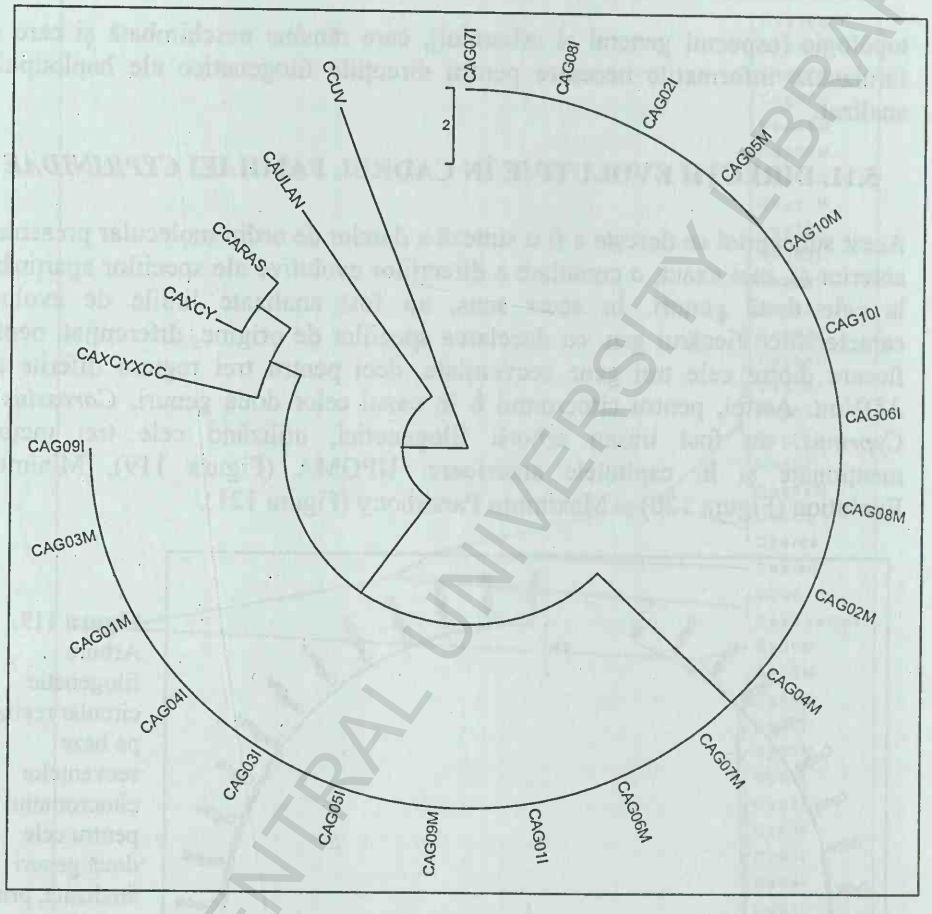


Figura 118. Arbore filogenetic al genului *Carassius*, realizat prin metoda ME pe baza secvenţelor ND4L

Din figurile 116 şi 117, pe baza diferenţelor dintre secvenţe şi a sumei lungimilor braţelor, se constată că individul a cărui secvenţă a fost preluată din banca de gene provine dintr-un nod comun ancestral, cu ramurile din care au evoluat speciile celor două populaţii. De asemenea, pentru cele două populaţii analizate, se observă că indivizii acestora se grupează diferenţiat. Se constată, din cele două figuri, că există diferenţe în cadrul arborelui, date de poziţiile ramurilor interioare, dar care nu prezintă o importanţă la fel de mare ca

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

topologia (aspectul general al arborelui), care rămâne neschimbată şi care ne furnizează informaţile necesare pentru direcţiile filogenetice ale haplotipului analizat.

5.11. DIRECŢII EVOLUTIVE ÎN CADRUL FAMILIEI *CYPRINIDAE*

Acest subcapitol se doreşte a fi o sinteză a datelor de ordin molecular prezentate anterior şi, mai exact, o cumulare a direcţiilor evolutive ale speciilor aparţinând la cele două genuri. În acest sens, au fost analizate liniile de evoluţie caracteristice fiecărui gen, cu decelarea speciilor de origine, diferenţiat, pentru fiecare dintre cele trei gene secvenţiate, deci pentru trei regiuni diferite ale ADNmt. Astfel, pentru citocromul b în cazul celor două genuri, *Carassius* şi *Cyprinus*, au fost trasaţi arborii filogenetici, utilizând cele trei metode menţionate şi în capitolele anterioare: UPGMA (Figura 119), Minimum Evolution (Figura 120) şi Maximum Parsimony (Figura 121).

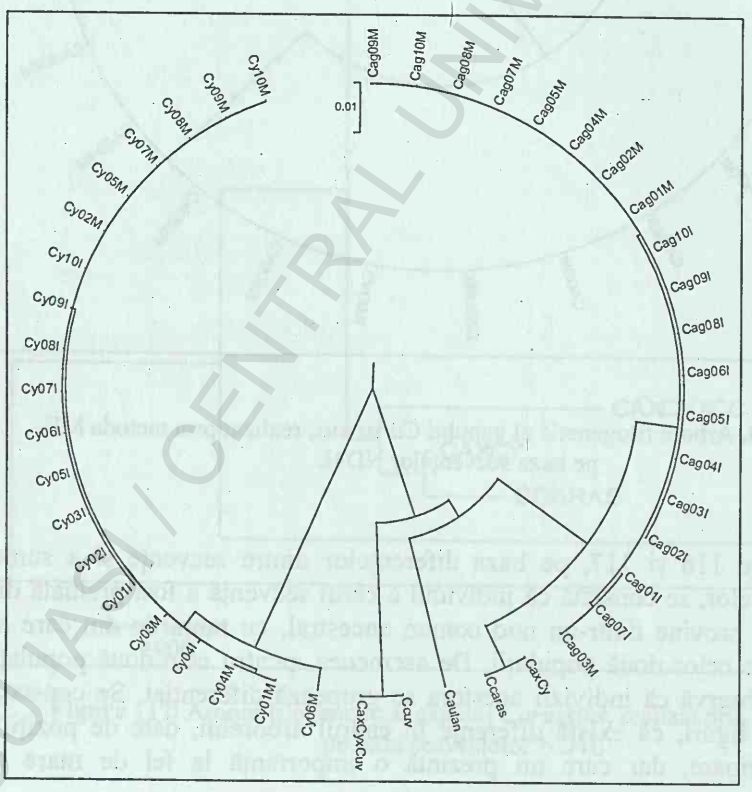


Figura 119. Arbore filogenetic circular realizat pe baza secvenţelor citocromului b, pentru cele două genuri analizate, prin metoda UPGMA

BCU IAŞI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

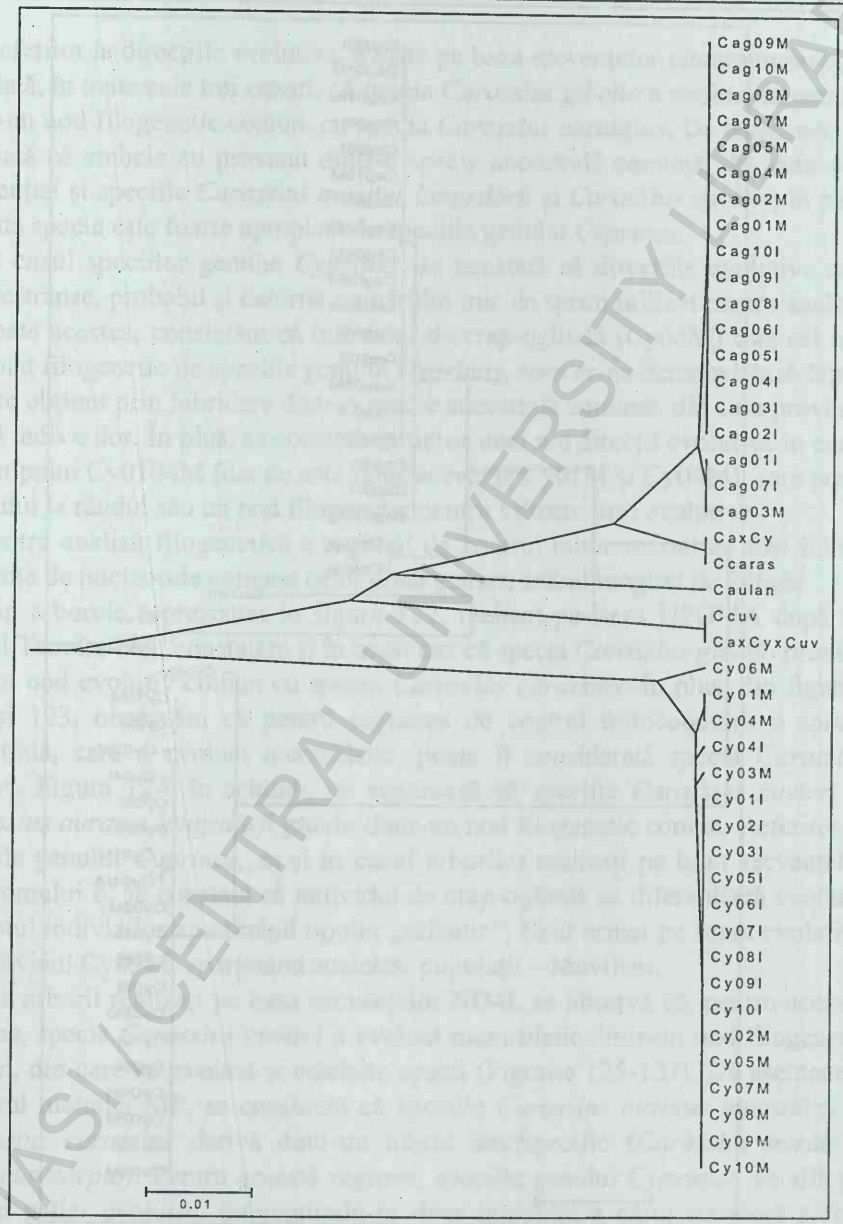


Figura 120. Arbore filogenetic realizat pe baza secvențelor citocromului b, pentru cele două genuri analizate, prin metoda ME

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

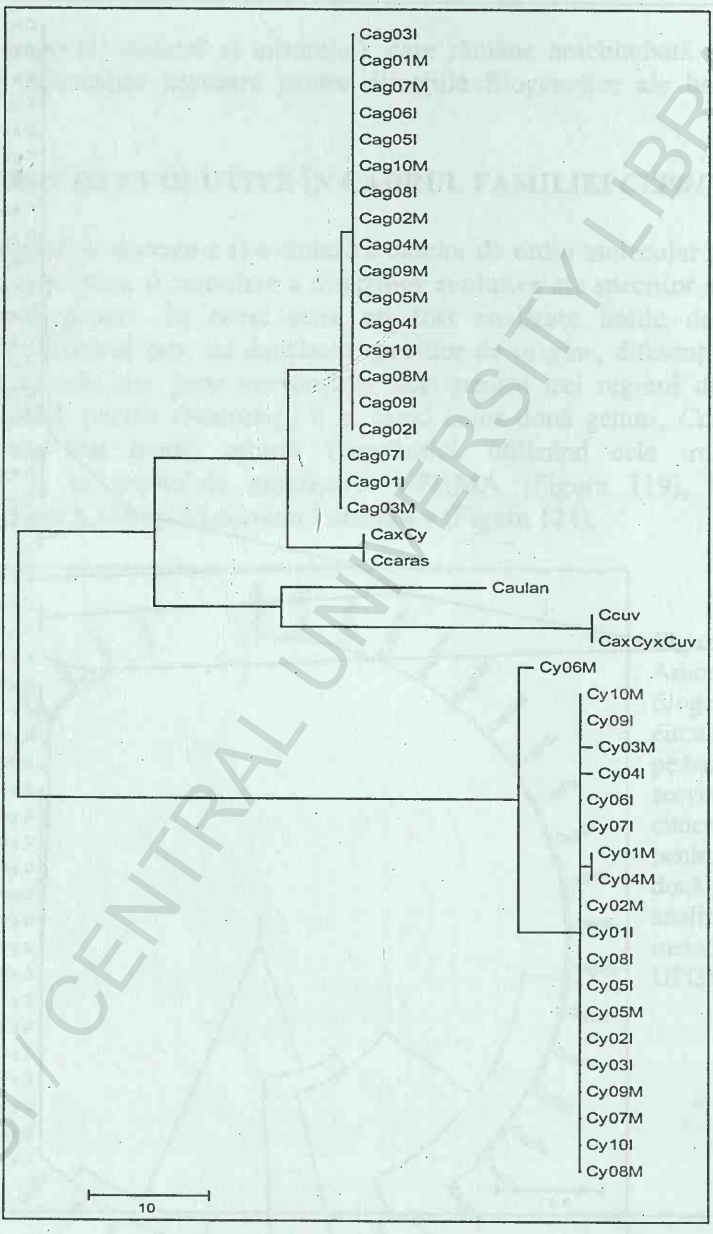


Figura 121. Arbore filogenetic realizat pe baza secvenţelor citocromului b, pentru cele două genuri analizate, prin metoda MP

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Referitor la direcţiile evolutive, trasate pe baza secvenţelor citocromului b, se constată, în toate cele trei cazuri, că specia *Carassius gibelio* a evoluat în paralel, dintr-un nod filogenetic comun, cu specia *Carassius carassius*. De asemenea, se constată că ambele au provenit dintr-o specie ancestrală comună, din care s-au diferenţiat şi speciile *Carassius auratus langsdörfi* şi *Carassius cuvieri*; în plus, această specie este foarte apropiată de speciile genului *Cyprinus*.

În cazul speciilor genului *Cyprinus*, se constată că direcţiile evolutive sunt mai restrânse, probabil şi datorită numărului mic de specii utilizat pentru analiză. Cu toate acestea, constatăm că individul de crap-oglindă (Cy06M) este cel mai apropiat filogenetic de speciile genului *Cyprinus*, ceea ce ne demonstrează faptul că este obţinut prin hibridare dintr-o specie ancestrală comună, din care provin şi restul indivizilor. În plus, se constată iniţierea unei noi direcţii evolutive în cazul haplotipului Cy0104M (dat de cele două secvenţe Cy01M şi Cy04M), care poate constitui la rândul său un nod filogenetic pentru viitoare linii evolutive.

Pentru analiza filogenetică a regiunii de control mitocondrial au fost folosit secvenţe de nucleotide comune celor două genuri, având lungimi de 246pb.

Din arborele reprezentat în figura 122, realizat pe baza UPGMA după un model Tamura-Nei, constatăm şi în acest caz că specia *Carassius gibelio* provine ditr-un nod evolutiv comun cu specia *Carassius carassius*. În plus, din figurile 122 şi 123, observăm că pentru regiunea de control mitocondrial, o specie ancestrală, care a evoluat monofiletic, poate fi considerată specia *Carassius cuvieri*. Figura 124, în schimb, ne sugerează că speciile *Carassius cuvieri* şi *Carassius auratus langsdörfi* provin dintr-un nod filogenetic comun. Referitor la speciile genului *Cyprinus*, ca şi în cazul arborilor realizaţi pe baza secvenţelor citocromului b, se constată că individul de crap-oglindă se diferenţiază evolutiv de restul indivizilor aparţinând tipului „sălbatic", fiind urmat pe scara evolutivă de individul Cy05M, aparţinând aceleiaşi populaţii – Movileni.

Din arborii realizaţi pe baza secvenţelor ND4L se observă că, pentru această regiune, specia *Carassius cuvieri* a evoluat monofiletic dintr-un nod filogenetic comun, din care au evoluat şi celelalte specii (Figurile 125-127). De asemenea, în cazul metodei MP, se consideră că speciile *Carassius auratus langsdörfi* şi *Carassius carassius* derivă dintr-un hibrid interspecific (*Carassius aurats x Cyprinus carpio)*. Pentru această regiune, speciile genului *Cyprinus* se află pe acelaşi palier evolutiv, diferenţiindu-se doar individul a cărui secvenţă a fost preluată din banca de gene.

BCU "VASILE GOLDIŞ" LIBRARY

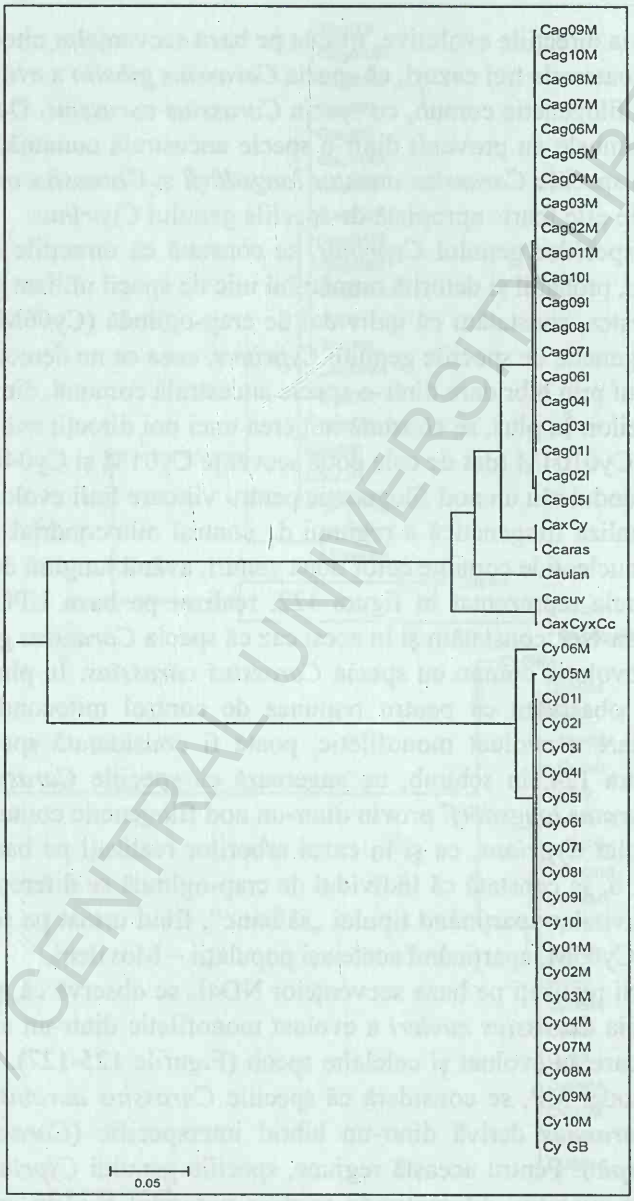


Figura 122. Arbore filogenetic realizat pe baza secvențelor d-loop, pentru cele două genuri analizate, prin metoda UPGMA

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

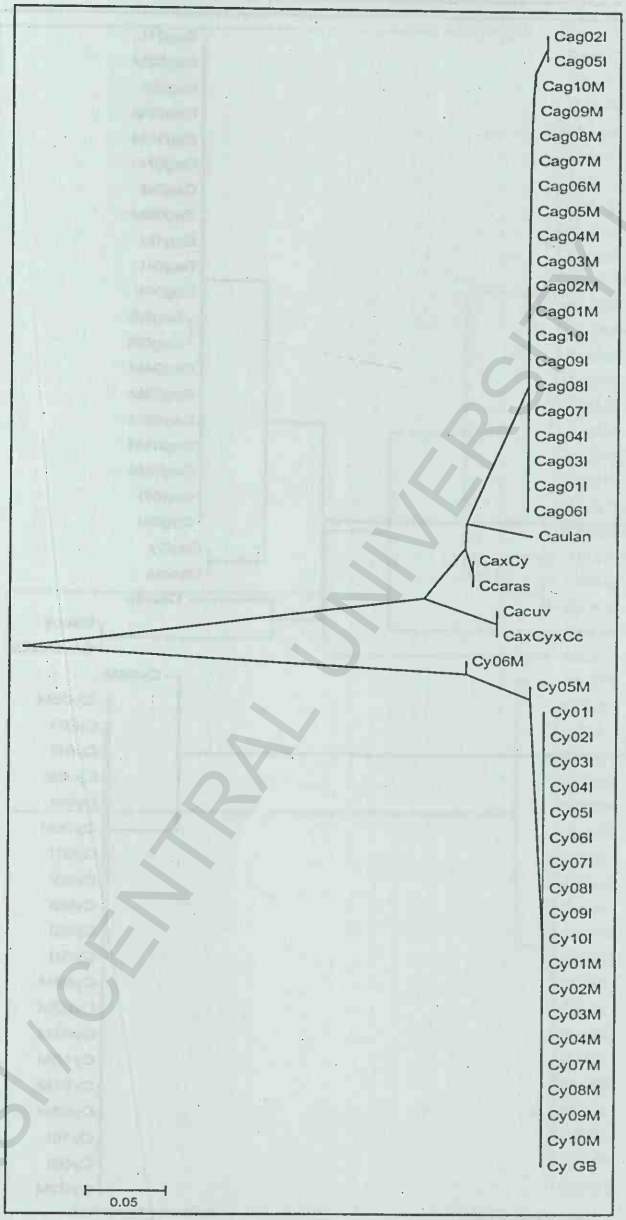


Figura 123. Arbore filogenetic realizat pe baza secvențelor d-loop, pentru cele două genuri analizate, prin metoda ME

BCU IAȘI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

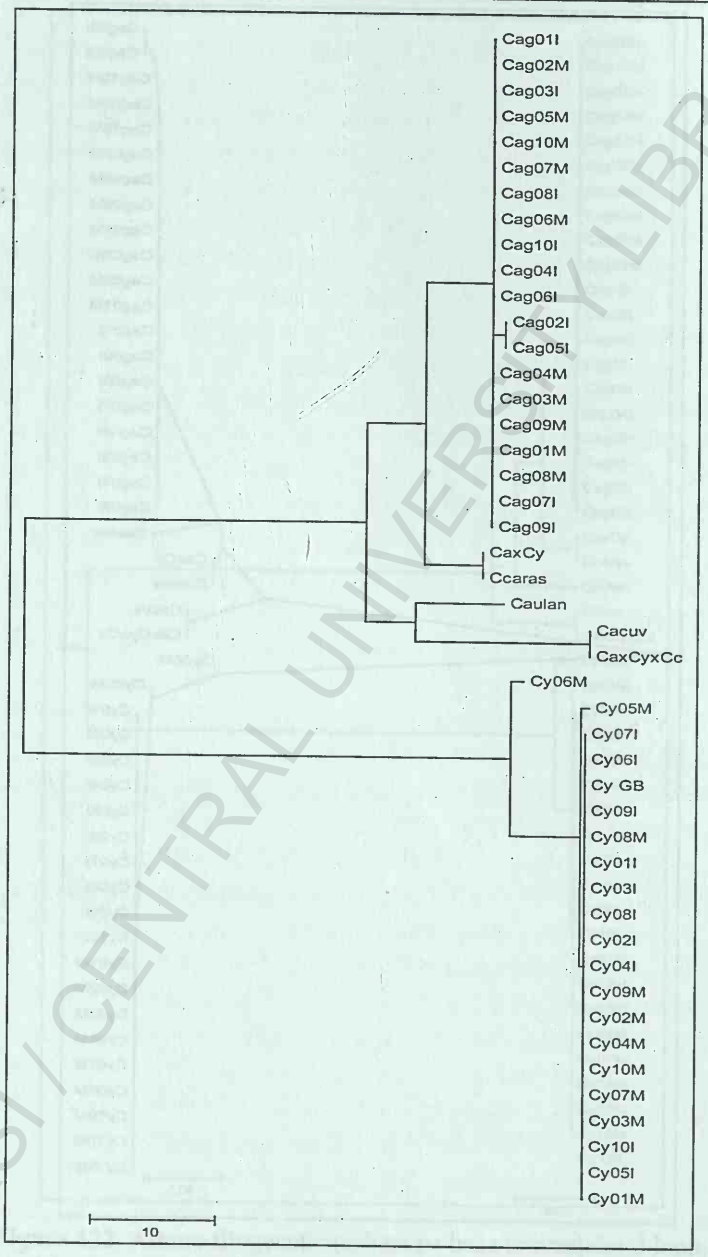


Figura 124. Arbore filogenetic realizat pe baza secvențelor d-loop, pentru cele două genuri analizate, prin metoda MP

BCU IAȘI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

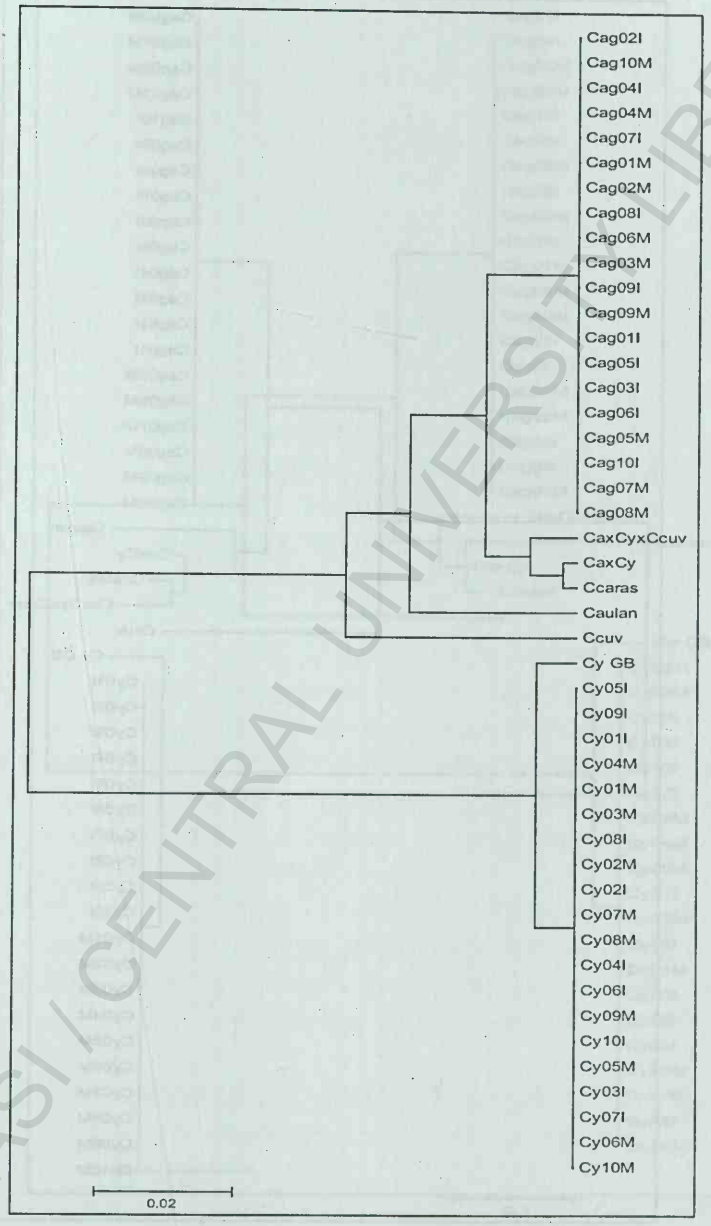


Figura 125. Arbore filogenetic realizat pe baza secvenţelor ND4L, pentru cele două genuri analizate, prin metoda UPGMA

BCU IAŞI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

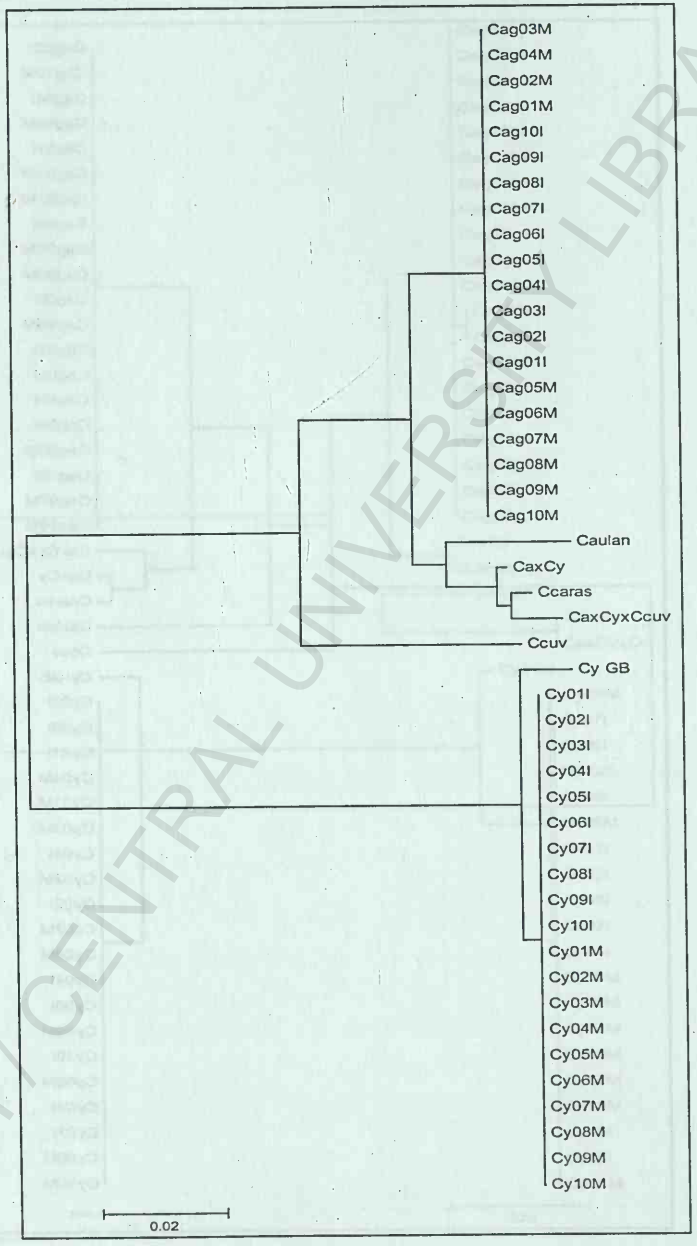


Figura 126. Arbore filogenetic realizat pe baza secvențelor ND4L, pentru cele două genuri analizate, prin metoda ME

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

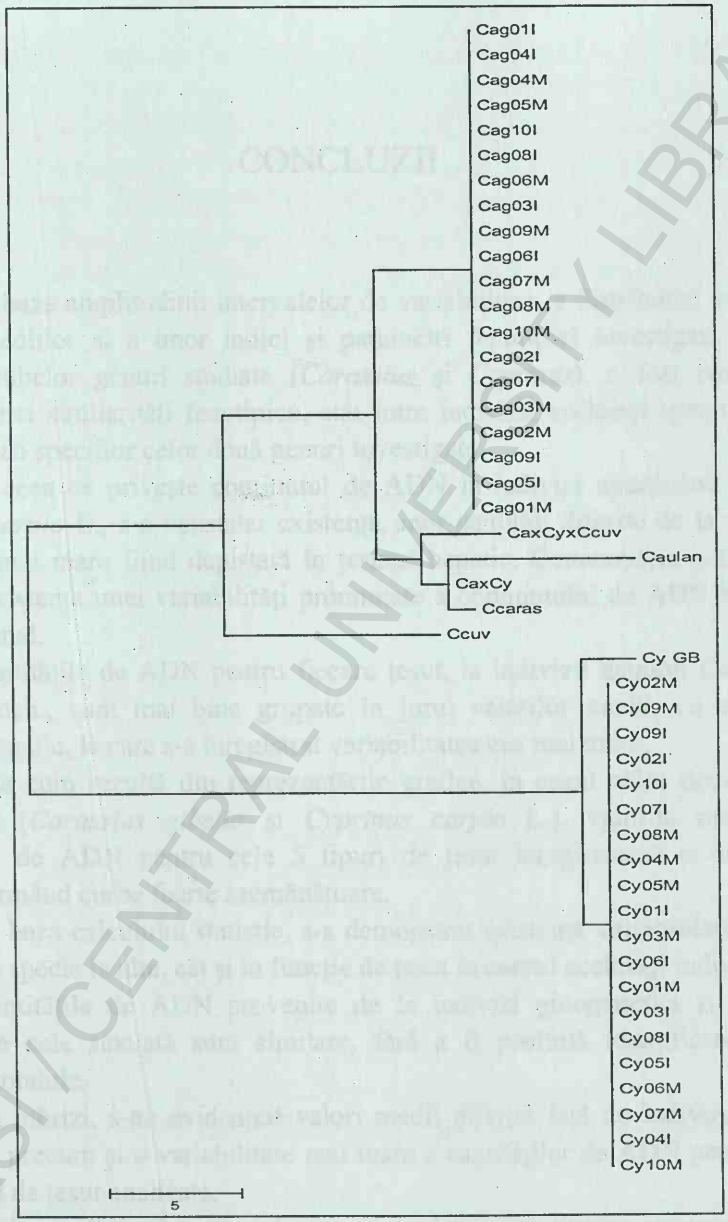


Figura 127. Arbore filogenetic realizat pe baza secvențelor ND4L, pentru cele două genuri analizate, prin metoda MP

BCU IAȘI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

CONCLUZII

➢ Pe baza amplitudinii intervalelor de variabilitate, a distribuției valorilor în jurul mediilor și a unor indici și parametri fenotipici investigați, pentru indivizii ambelor genuri studiate (*Carassius* și *Cyprinus*), a fost constatată existența unei similarități fenotipice, atât între indivizii aceleiași specii, cât și între indivizii speciilor celor două genuri investigate.

➢ În ceea ce privește conținutul de ADN la indivizi aparținând speciei *Cyprinus carpio* L., s-a constatat existența unor cantități diferite de la țesut la țesut, cea mai mare fiind depistată în țesutul hepatic. Concomitent s-a pus în evidență existența unei variabilități pronunțate a conținutului de ADN în cazul țesutului renal.

➢ Cantitățile de ADN pentru fiecare țesut, la indivizii genului *Carassius gibelio* Bloch., sunt mai bine grupate în jurul valorilor medii, cu excepția țesutului hepatic, la care s-a înregistrat variabilitatea cea mai mare.

➢ Așa cum rezultă din reprezentările grafice, în cazul celor două specii investigate (*Carassius gibelio* și *Cyprinus carpio* L.), valorile medii ale cantităților de ADN pentru cele 5 tipuri de țesut înregistrează o dinamică similară, urmând curbe foarte asemănătoare.

➢ Pe baza calculului statistic, s-a demonstrat existența variabilității ADN, atât de la o specie la alta, cât și în funcție de țesut în cadrul aceluiași individ.

➢ Cantitățile de ADN provenite de la indivizi ginogenetici și indivizi obținuți pe cale sexuată sunt similare, fără a fi posibilă identificarea unor diferențe notabile.

➢ La hibrizi, s-au evidențiat valori medii diferite față de indivizii de tip „sălbatic", precum și o variabilitate mai mare a cantităților de ADN pentru cele cinci tipuri de țesut analizate.

➢ Pe baza alinierii secvențelor genei ce determină sinteza citocromului b, provenite de la indivizi ai speciei *Cyprinus carpio* L., au fost constatate 15 diferențe, stabilindu-se 5 noi haplotipuri: un haplotip general pentru ambele populații, Cy04I (pentru populația Iași), Cy0104M, Cy03M (pentru populația

BCU IAȘI CENTRU UNIVERSITAR LIBRARY

Larga-Jijia – Movileni) şi Cy06M (pentru populaţia de crap-oglindă Larga-Jiia – Movileni).

➢ Referitor la secvenţele d-loop provenite de la indivizi ai speciei *Cyprinus carpio* L., s-a constatat existenţa a 11 diferenţe doar în cazul indivizilor populaţiei Mărgineni, ceea ce a condus la stabilirea a 4 noi haplotipuri pentru prima parte a regiunii de control mitocondrial: Cy01M, Cy05M şi Cy06M şi haplotipul general.

➢ Pentru secvenţele ND4L provenite de la indivizi ai speciei *Cyprinus carpio* L., nu au fost constatate diferenţe în urma alinierilor, ceea ce a permis stabilirea unui singur haplotip, caracteristic celor două populaţii.

➢ Comparând secvenţe ce determină sinteza citocromului b, provenite de la indivizi ai speciei *Carassius gibelio* Bloch., se constată existenţa a trei diferenţe, pe baza cărora au fost stabilite două haplotipuri.

Apreciem că stabilirea căilor filiaţiei pe criterii moleculare este benefică pentru activităţile de selecţie şi ameliorare, deoarece permite determinarea cu mai multă exactitate a hibrizilor, a genitorilor acestora, precum şi a sexului genitorilor.

➢ Înlocuirea speciei *Carassius carassius* de către *Carassius gibelio*, în aproape toate biocenozele, dovedeşte o adaptare mai bună a ultimei specii la condiţiile actuale şi argumentează situarea ei pe o treaptă evolutivă superioară.

➢ Comparând secvenţele care provin de la indivizi ai celor două populaţii analizate, se constată existenţa unei singure diferenţe (în trei secvenţe) pentru d-loop, ceea ce a determinat obţinerea a două haplotipuri pentru această genă.

➢ Conform aşteptărilor din analiza tuturor secvenţelor, s-a constatat că rata de apariţie a tranziţiilor este mai mare decât cea de apariţie a transversiilor.

➢ Analizând secvenţele subunităţii 4L a dehidrogenazei, s-a constatat că această regiune este conservativă, prezentând un potenţial mutagen foarte scăzut.

➢ Pe baza datelor obţinute pentru cele două specii (*Carassius gibelio* Bloch. şi *Cyprinus carpio* L.), pentru secvenţele d-loop şi ale genei ce determină sinteza citocromului b, putem aprecia că asistăm la un proces incipient de naştere a noi direcţii evolutive.

➢ Pe baza secvenţelor citocromului b, se constată că speciile *Carassius gibelio* şi *Carassius carassius* au evoluat în paralel dintr-un nod filogenetic comun care, la rândul său, provine dintr-o specie ancestrală comună, din care s-au diferenţiat anterior speciile *Carassius auratus langsdörfi* şi *Carassius cuvieri*.

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

➢ Secvențele regiunii de control mitocondrial, provenite de la indivizi ai speciei *Carassius gibelio*, sugerează existența a noi direcții evolutive (în cadrul ambelor populații analizate), dar şi asemănări între specia *Carassius cuvieri* şi speciile genului *Cyprinus* (în cadrul căruia nu se disting direcții evolutive diferite decât pentru varietatea de crap-oglindă).

➢ Dimpotrivă, conform structurii conservative a ND4L redată în arborii filogenetici prezentați, pentru ambele populații ale speciilor luate în studiu, nu se constată inițierea de noi direcții evolutive.

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

ANEXA 1

ALINIEREA SECVENȚELOR CITOCROMULUI B PROVENITE DE LA INDIVIZI AI GENULUI *CYPRINUS*

```
A T G G C A A G C C T A C G A A A A A C A C A C C C T C T C
                    10                  20                  30
A T G G C A A G C C T A C G A A A A A C A C A C C C T C T C   Cy01I
A T G G C A A G C C T A C G A A A A A C A C A C C C T C T C   Cy02I
A T G G C A A G C C T A C G A A A A A C A C A C C C T C T C   Cy03I
A T G G C A A G C C T A C G A A A A A C A C A C C C T C T C   Cy04I
A T G G C A A G C C T A C G A A A A A C A C A C C C T C T C   Cy05I
A T G G C A A G C C T A C G A A A A A C A C A C C C T C T C   Cy06I
A T G G C A A G C C T A C G A A A A A C A C A C C C T C T C   Cy07I
A T G G C A A G C C T A C G A A A A A C A C A C C C T C T C   Cy08I
A T G G C A A G C C T A C G A A A A A C A C A C C C T C T C   Cy09I
A T G G C A A G C C T A C G A A A A A C A C A C C C T C T C   Cy10I
A T G G C A A G C C T A C G A A A A A C A C A C C C T C T C   Cy01M
A T G G C A A G C C T A C G A A A A A C A C A C C C T C T C   Cy02M
A T G G C A A G C C T A C G A A A A A C A C A C C C T C T C   Cy03M
A T G G C A A G C C T A C G A A A A A C A C A C C C T C T C   Cy04M
A T G G C A A G C C T A C G A A A A A C A C A C C C T C T C   Cy05M
A T G G C A A G C C T A C G A A A A A C A C A C C C T C T C   Cy06M
A T G G C A A G C C T A C G A A A A A C A C A C C C T C T C   Cy07M
A T G G C A A G C C T A C G A A A A A C A C A C C C T C T C   Cy08M
A T G G C A A G C C T A C G A A A A A C A C A C C C T C T C   Cy09M
A T G G C A A G C C T A C G A A A A A C A C A C C C T C T C   Cy10M

A T T A A A A T C G C T A A C G A C G C A C T A G T T G A C
                    40                  50                  60
A T T A A A A T C G C T A A C G A C G C A C T A G T T G A C   Cy01I
A T T A A A A T C G C T A A C G A C G C A C T A G T T G A C   Cy02I
A T T A A A A T C G C T A A C G A C G C A C T A G T T G A C   Cy03I
A T T A A A A T C G C T A A C G A C G C A C T A G T T G A C   Cy04I
A T T A A A A T C G C T A A C G A C G C A C T A G T T G A C   Cy05I
A T T A A A A T C G C T A A C G A C G C A C T A G T T G A C   Cy06I
A T T A A A A T C G C T A A C G A C G C A C T A G T T G A C   Cy07I
A T T A A A A T C G C T A A C G A C G C A C T A G T T G A C   Cy08I
A T T A A A A T C G C T A A C G A C G C A C T A G T T G A C   Cy09I
A T T A A A A T C G C T A A C G A C G C A C T A G T T G A C   Cy10I
A T T A A A A T C G C T A A C G A C G C A C T A G T T G A C   Cy01M
A T T A A A A T C G C T A A C G A C G C A C T A G T T G A C   Cy02M
A T T A A A A T C G C T A A C G A C G C A C T A G T T G A C   Cy03M
A T T A A A A T C G C T A A C G A C G C A C T A G T T G A C   Cy04M
A T T A A A A T C G C T A A C G A C G C A C T A G T T G A C   Cy05M
A T T A A A A T C G C T A A C G A C G C A C T A G T T G A C   Cy06M
A T T A A A A T C G C T A A C G A C G C A C T A G T T G A C   Cy07M
A T T A A A A T C G C T A A C G A C G C A C T A G T T G A C   Cy08M
A T T A A A A T C G C T A A C G A C G C A C T A G T T G A C   Cy09M
A T T A A A A T C G C T A A C G A C G C A C T A G T T G A C   Cy10M
```

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

```
C T A C C A A C A C C A T C C A A C A T C T C A G C A T G A
                    70                  80                  90
C T A C C A A C A C C A T C C A A C A T C T C A G C A T G A Cy01I
C T A C C A A C A C C A T C C A A C A T C T C A G C A T G A Cy02I
C T A C C A A C A C C A T C C A A C A T C T C A G C A T G A Cy03I
C T A C C A A C A C C A T C C A A C A T C T C A G C A T G A Cy04I
C T A C C A A C A C C A T C C A A C A T C T C A G C A T G A Cy05I
C T A C C A A C A C C A T C C A A C A T C T C A G C A T G A Cy06I
C T A C C A A C A C C A T C C A A C A T C T C A G C A T G A Cy07I
C T A C C A A C A C C A T C C A A C A T C T C A G C A T G A Cy08I
C T A C C A A C A C C A T C C A A C A T C T C A G C A T G A Cy09I
C T A C C A A C A C C A T C C A A C A T C T C A G C A T G A Cy10I
C T A C C A A C A C C A T C C A A C A T C T C A G C A T G A Cy01M
C T A C C A A C A C C A T C C A A C A T C T C A G C A T G A Cy02M
C T A C C A A C A C C A T C C A A C A T C T C A G C A T G A Cy03M
C T A C C A A C A C C A T C C A A C A T C T C A G C A T G A Cy04M
C T A C C A A C A C C A T C C A A C A T C T C A G C A T G A Cy05M
C T A C C A A C A C C A T C C A A C A T C T C A G C A T G A Cy06M
C T A C C A A C A C C A T C C A A C A T C T C A G C A T G A Cy07M
C T A C C A A C A C C A T C C A A C A T C T C A G C A T G A Cy08M
C T A C C A A C A C C A T C C A A C A T C T C A G C A T G A Cy09M
C T A C C A A C A C C A T C C A A C A T C T C A G C A T G A Cy10M

T G A A A C T T T G G A T C C C T C C T A G G A C T A T G C
                   100                 110                 120
T G A A A C T T T G G A T C C C T C C T A G G A C T A T G C Cy01I
T G A A A C T T T G G A T C C C T C C T A G G A C T A T G C Cy02I
T G A A A C T T T G G A T C C C T C C T A G G A C T A T G C Cy03I
T G A A A C T T T G G A T C C C T C C T A G G A C T A T G C Cy04I
T G A A A C T T T G G A T C C C T C C T A G G A C T A T G C Cy05I
T G A A A C T T T G G A T C C C T C C T A G G A C T A T G C Cy06I
T G A A A C T T T G G A T C C C T C C T A G G A C T A T G C Cy07I
T G A A A C T T T G G A T C C C T C C T A G G A C T A T G C Cy08I
T G A A A C T T T G G A T C C C T C C T A G G A C T A T G C Cy09I
T G A A A C T T T G G A T C C C T C C T A G G A C T A T G C Cy10I
T G A A A C T T T G G A T C C C T C C T A G G A C T A T G C Cy01M
T G A A A C T T T G G A T C C C T C C T A G G A C T A T G C Cy02M
T G A A A C T T T G G A T C C C T C C T A G G A C T A T G C Cy03M
T G A A A C T T T G G A T C C C T C C T A G G A C T A T G C Cy04M
T G A A A C T T T G G A T C C C T C C T A G G A C T A T G C Cy05M
T G A A A C T T T G G A T C C C T C C T A G G A C T A T G C Cy06M
T G A A A C T T T G G A T C C C T C C T A G G A C T A T G C Cy07M
T G A A A C T T T G G A T C C C T C C T A G G A C T A T G C Cy08M
T G A A A C T T T G G A T C C C T C C T A G G A C T A T G C Cy09M
T G A A A C T T T G G A T C C C T C C T A G G A C T A T G C Cy10M
```

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

```
T T A A T T A C C C A A A T T T T A A C C G G G C C T A T T C
                  130                 140                 150
T T A A T T A C C C A A A T T T T A A C C G G G C C T A T T C  Cy01I
T T A A T T A C C C A A A T T T T A A C C G G G C C T A T T C  Cy02I
T T A A T T A C C C A A A T T T T A A C C G G G C C T A T T C  Cy03I
T T A A T T A C C C A A A T T T T A A C C G G G C C T A T T C  Cy04I
T T A A T T A C C C A A A T T T T A A C C G G G C C T A T T C  Cy05I
T T A A T T A C C C A A A T T T T A A C C G G G C C T A T T C  Cy06I
T T A A T T A C C C A A A T T T T A A C C G G G C C T A T T C  Cy07I
T T A A T T A C C C A A A T T T T A A C C G G G C C T A T T C  Cy08I
T T A A T T A C C C A A A T T T T A A C C G G G C C T A T T C  Cy09I
T T A A T T A C C C A A A T T T T A A C C G G G C C T A T T C  Cy10I
T T A A T T A C C C A A A T T T T A A C C G G G C C T A T T C  Cy01M
T T A A T T A C C C A A A T T T T A A C C G G G C C T A T T C  Cy02M
T T A A T T A C C C A A A T T T T A A C C G G G C C T A T T C  Cy03M
T T A A T T A C C C A A A T T T T A A C C G G G C C T A T T C  Cy04M
T T A A T T A C C C A A A T T T T A A C C G G G C C T A T T C  Cy05M
T T A A T T A C C C A A A T T T T A A C C G G G C C T A T T C  Cy06M
T T A A T T A C C C A A A T T T T A A C C G G G C C T A T T C  Cy07M
T T A A T T A C C C A A A T T T T A A C C G G G C C T A T T C  Cy08M
T T A A T T A C C C A A A T T T T A A C C G G G C C T A T T C  Cy09M
T T A A T T A C C C A A A T T T T A A C C G G G C C T A T T C  Cy10M

C T A G C C A T A C A C T A C A C C T C A G A C A T C T C A
                  160                 170                 180
C T A G C C A T A C A C T A C A C C T C A G A C A T C T C A  Cy01I
C T A G C C A T A C A C T A C A C C T C A G A C A T C T C A  Cy02I
C T A G C C A T A C A C T A C A C C T C A G A C A T C T C A  Cy03I
C T A G C C A T A C A C T A C A C C T C A G A C A T C T C A  Cy04I
C T A G C C A T A C A C T A C A C C T C A G A C A T C T C A  Cy05I
C T A G C C A T A C A C T A C A C C T C A G A C A T C T C A  Cy06I
C T A G C C A T A C A C T A C A C C T C A G A C A T C T C A  Cy07I
C T A G C C A T A C A C T A C A C C T C A G A C A T C T C A  Cy08I
C T A G C C A T A C A C T A C A C C T C A G A C A T C T C A  Cy09I
C T A G C C A T A C A C T A C A C C T C A G A C A T C T C A  Cy10I
C T A G C C A T A C A C T A C A C C T C A G A C A T C T C A  Cy01M
C T A G C C A T A C A C T A C A C C T C A G A C A T C T C A  Cy02M
C T A G C C A T A C A C T A C A C C T C A G A C A T C T C A  Cy03M
C T A G C C A T A C A C T A C A C C T C A G A C A T C T C A  Cy04M
C T A G C C A T A C A C T A C A C C T C A G A C A T C T C A  Cy05M
C T A G C C A T A C A C T A C A C C T C A G A C A T T C A  Cy06M
C T A G C C A T A C A C T A C A C C T C A G A C A T C T C A  Cy07M
C T A G C C A T A C A C T A C A C C T C A G A C A T C T C A  Cy08M
C T A G C C A T A C A C T A C A C C T C A G A C A T C T C A  Cy09M
C T A G C C A T A C A C T A C A C C T C A G A C A T C T C A  Cy10M
```

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

```
A C C G C A T T C T C A T C T G T T A C C C A C A T C T G C
                          190                 200                 210
A C C G C A T T C T C A T C T G T T A C C C A C A T C T G C  Cy01I
A C C G C A T T C T C A T C T G T T A C C C A C A T C T G C  Cy02I
A C C G C A T T C T C A T C T G T T A C C C A C A T C T G C  Cy03I
A C C G C A T T C T C A T C T G T T A C C C A C A T C T G C  Cy04I
A C C G C A T T C T C A T C T G T T A C C C A C A T C T G C  Cy05I
A C C G C A T T C T C A T C T G T T A C C C A C A T C T G C  Cy06I
A C C G C A T T C T C A T C T G T T A C C C A C A T C T G C  Cy07I
A C C G C A T T C T C A T C T G T T A C C C A C A T C T G C  Cy08I
A C C G C A T T C T C A T C T G T T A C C C A C A T C T G C  Cy09I
A C C G C A T T C T C A T C T G T T A C C C A C A T C T G C  Cy10I
A C C G C A T T C T C A T C T G T T A C C C A C A T C T G C  Cy01M
A C C G C A T T C T C A T C T G T T A C C C A C A T C T G C  Cy02M
A C C G C A T T C T C A T C T G T T A C C C A C A T C T G C  Cy03M
A C C G C A T T C T C A T C T G T T A C C C A C A T C T G C  Cy04M
A C C G C A T T C T C A T C T G T T A C C C A C A T C T G C  Cy05M
A C C G C A T T C T C A T C T G T C A C C C A C A T C T G C  Cy06M
A C C G C A T T C T C A T C T G T T A C C C A C A T C T G C  Cy07M
A C C G C A T T C T C A T C T G T T A C C C A C A T C T G C  Cy08M
A C C G C A T T C T C A T C T G T T A C C C A C A T C T G C  Cy09M
A C C G C A T T C T C A T C T G T T A C C C A C A T C T G C  Cy10M

C G A G A C G T A A A T T A C G G C T G A C T A A T C C G T
                          220                 230                 240
C G A G A C G T A A A T T A C G G C T G A C T A A T C C G T  Cy01I
C G A G A C G T A A A T T A C G G C T G A C T A A T C C G T  Cy02I
C G A G A C G T A A A T T A C G G C T G A C T A A T C C G T  Cy03I
C G A G A C G T A A A T T A C G G C T G A C T A A T C C G T  Cy04I
C G A G A C G T A A A T T A C G G C T G A C T A A T C C G T  Cy05I
C G A G A C G T A A A T T A C G G C T G A C T A A T C C G T  Cy06I
C G A G A C G T A A A T T A C G G C T G A C T A A T C C G T  Cy07I
C G A G A C G T A A A T T A C G G C T G A C T A A T C C G T  Cy08I
C G A G A C G T A A A T T A C G G C T G A C T A A T C C G T  Cy09I
C G A G A C G T A A A T T A C G G C T G A C T A A T C C G T  Cy10I
C G A G A C G T A A A T T A C G G C T G A C T A A T C C G T  Cy01M
C G A G A C G T A A A T T A C G G C T G A C T A A T C C G T  Cy02M
C G A G A C G T A A A T T A C G G C T G A C T A A T C C G T  Cy03M
C G A G A C G T A A A T T A C G G C T G A C T A A T C C G T  Cy04M
C G A G A C G T A A A T T A C G G C T G A C T A A T C C G T  Cy05M
C G A G A C G T A A A T T A C G G C T G A C T A A T C C G T  Cy06M
C G A G A C G T A A A T T A C G G C T G A C T A A T C C G T  Cy07M
C G A G A C G T A A A T T A C G G C T G A C T A A T C C G T  Cy08M
C G A G A C G T A A A T T A C G G C T G A C T A A T C C G T  Cy09M
C G A G A C G T A A A T T A C G G C T G A C T A A T C C G T  Cy10M
```

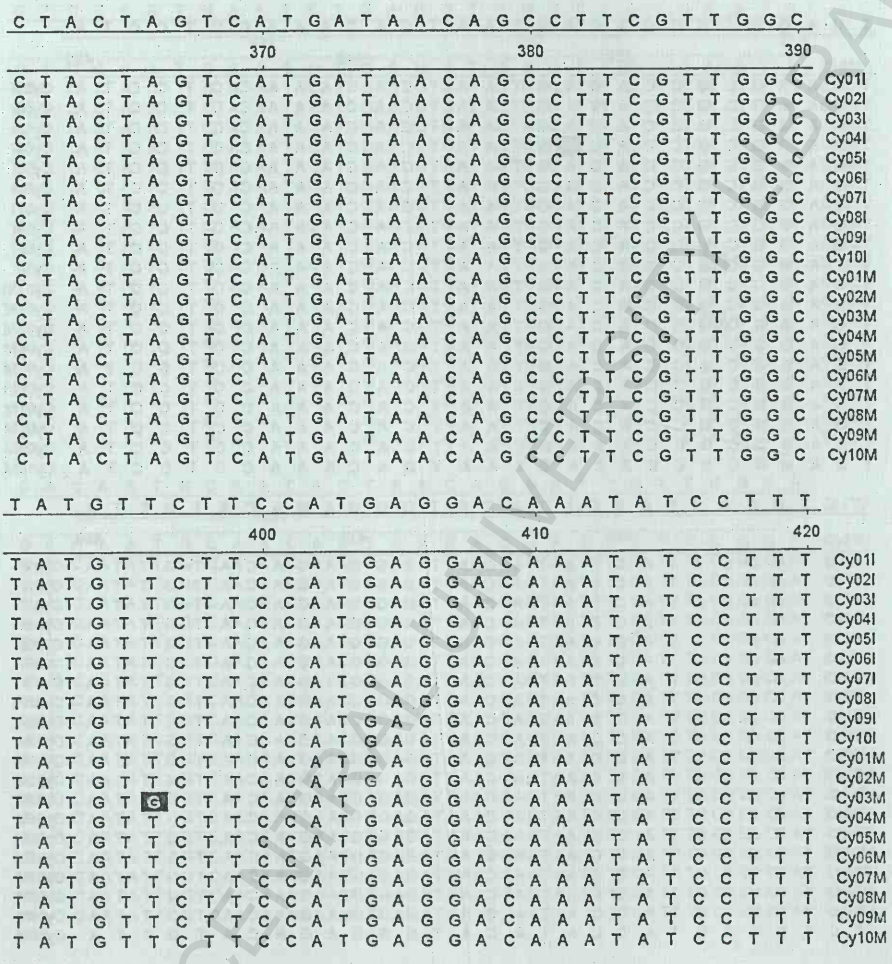
BCU IAŞI / CENTRUL UNIVERSITAR BIBLIOTECA

```
A A T G T A C A C G C C A A C G G A G C A T C A T T C T T C
                    250                     260                     270
A A T G T A C A C G C C A A C G G A G C A T C A T T C T T C   Cy01I
A A T G T A C A C G C C A A C G G A G C A T C A T T C T T C   Cy02I
A A T G T A C A C G C C A A C G G A G C A T C A T T C T T C   Cy03I
A A T G T A C A C G C C A A C G G A G C A T C A T T C T T C   Cy04I
A A T G T A C A C G C C A A C G G A G C A T C A T T C T T C   Cy05I
A A T G T A C A C G C C A A C G G A G C A T C A T T C T T C   Cy06I
A A T G T A C A C G C C A A C G G A G C A T C A T T C T T C   Cy07I
A A T G T A C A C G C C A A C G G A G C A T C A T T C T T C   Cy08I
A A T G T A C A C G C C A A C G G A G C A T C A T T C T T C   Cy09I
A A T G T A C A C G C C A A C G G A G C A T C A T T C T T C   Cy10I
A A T G T A C A C G C C A A C G G A G C A T C A T T C T T C   Cy01M
A A T G T A C A C G C C A A C G G A G C A T C A T T C T T C   Cy02M
A A T G T A C A C G C C A A C G G A G C A T C A T T C T T C   Cy03M
A A T G T A C A C G C C A A C G G A G C A T C A T T C T T C   Cy04M
A A T G T A C A C G C C A A C G G A G C A T C A T T C T T C   Cy05M
A A T G T A C A C G C C A A C G G A G C A T C A T T C T T C   Cy06M
A A T G T A C A C G C C A A C G G A G C A T C A T T C T T C   Cy07M
A A T G T A C A C G C C A A C G G A G C A T C A T T C T T C   Cy08M
A A T G T A C A C G C C A A C G G A G C A T C A T T C T T C   Cy09M
A A T G T A C A C G C C A A C G G A G C A T C A T T C T T C   Cy10M

T T C A T T T G C A T T T A C A T A C A C A T C G C C C G A
                    280                     290                     300
T T C A T T T G C A T T T A C A T A C A C A T C G C C C G A   Cy01I
T T C A T T T G C A T T T A C A T A C A C A T C G C C C G A   Cy02I
T T C A T T T G C A T T T A C A T A C A C A T C G C C C G A   Cy03I
T T C A T T T G C A T T T A C A T A C A C A T C G C C C G A   Cy04I
T T C A T T T G C A T T T A C A T A C A C A T C G C C C G A   Cy05I
T T C A T T T G C A T T T A C A T A C A C A T C G C C C G A   Cy06I
T T C A T T T G C A T T T A C A T A C A C A T C G C C C G A   Cy07I
T T C A T T T G C A T T T A C A T A C A C A T C G C C C G A   Cy08I
T T C A T T T G C A T T T A C A T A C A C A T C G C C C G A   Cy09I
T T C A T T T G C A T T T A C A T A C A C A T C G C C C G A   Cy10I
T T C A T T T G C A T T T A C A T A C A C A T C G C C C G A   Cy01M
T T C A T T T G C A T T T A C A T A C A C A T C G C C C G A   Cy02M
T T C A T T T G C A T T T A C A T A C A C A T C G C C C G A   Cy03M
T T C A T T T G C A T T T A C A T A C A C A T C G C C C G A   Cy04M
T T C A T T T G C A T T T A C A T A C A C A T C G C C C G A   Cy05M
T T C A T T T G C A T T T A C A T A C A C A T C G C C C G A   Cy06M
T T C A T T T G C A T T T A C A T A C A C A T C G C C C G A   Cy07M
T T C A T T T G C A T T T A C A T A C A C A T C G C C C G A   Cy08M
T T C A T T T G C A T T T A C A T A C A C A T C G C C C G A   Cy09M
T T C A T T T G C A T T T A C A T A C A C A T C G C C C G A   Cy10M
```

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

G	G	C	C	T	A	T	A	C	T	A	C	G	G	A	T	C	A	T	A	C	C	T	T	T	A	C	A	A	A	
									310										320										330	
G	G	C	C	T	A	T	A	C	T	A	C	G	G	A	T	C	A	T	A	C	C	T	T	T	A	C	A	A	A	Cy01I
G	G	C	C	T	A	T	A	C	T	A	C	G	G	A	T	C	A	T	A	C	C	T	T	T	A	C	A	A	A	Cy02I
G	G	C	C	T	A	T	A	C	T	A	C	G	G	A	T	C	A	T	A	C	C	T	T	T	A	C	A	A	A	Cy03I
G	G	C	C	T	A	T	A	C	T	A	C	G	G	A	T	C	A	T	A	C	C	T	T	T	A	C	A	A	A	Cy04I
G	G	C	C	T	A	T	A	C	T	A	C	G	G	A	T	C	A	T	A	C	C	T	T	T	A	C	A	A	A	Cy05I
G	G	C	C	T	A	T	A	C	T	A	C	G	G	A	T	C	A	T	A	C	C	T	T	T	A	C	A	A	A	Cy06I
G	G	C	C	T	A	T	A	C	T	A	C	G	G	A	T	C	A	T	A	C	C	T	T	T	A	C	A	A	A	Cy07I
G	G	C	C	T	A	T	A	C	T	A	C	G	G	A	T	C	A	T	A	C	C	T	T	T	A	C	A	A	A	Cy08I
G	G	C	C	T	A	T	A	C	T	A	C	G	G	A	T	C	A	T	A	C	C	T	T	T	A	C	A	A	A	Cy09I
G	G	C	C	T	A	T	A	C	T	A	C	G	G	A	T	C	A	T	A	C	C	T	T	T	A	C	A	A	A	Cy10I
G	G	C	C	T	A	T	A	C	T	A	C	G	G	A	T	C	A	T	A	C	C	T	T	T	A	C	A	A	A	Cy01M
G	G	C	C	T	A	T	A	C	T	A	C	G	G	A	T	C	A	T	A	C	C	T	T	T	A	C	A	A	A	Cy02M
G	G	C	C	T	A	T	A	C	T	A	C	G	G	A	T	C	A	T	A	C	C	T	T	T	A	C	A	A	A	Cy03M
G	G	C	C	T	A	T	A	C	T	A	C	G	G	A	T	C	A	T	A	C	C	T	T	T	A	C	A	A	A	Cy04M
G	G	C	C	T	A	T	A	C	T	A	C	G	G	A	T	C	A	T	A	C	C	T	T	T	A	C	A	A	A	Cy05M
G	G	C	C	T	A	T	A	C	T	A	C	G	G	A	T	C	A	T	A	C	C	T	T	T	A	C	A	A	A	Cy06M
G	G	C	C	T	A	T	A	C	T	A	C	G	G	A	T	C	A	T	A	C	C	T	T	T	A	C	A	A	A	Cy07M
G	G	C	C	T	A	T	A	C	T	A	C	G	G	A	T	C	A	T	A	C	C	T	T	T	A	C	A	A	A	Cy08M
G	G	C	C	T	A	T	A	C	T	A	C	G	G	A	T	C	A	T	A	C	C	T	T	T	A	C	A	A	A	Cy09M
G	G	C	C	T	A	T	A	C	T	A	C	G	G	A	T	C	A	T	A	C	C	T	T	T	A	C	A	A	A	Cy10M

G	A	A	A	C	C	T	G	A	A	A	C	A	T	T	G	G	T	G	T	A	A	T	C	C	T	T	C	T	A	
									340										350										360	
G	A	A	A	C	C	T	G	A	A	A	C	A	T	T	G	G	T	G	T	A	A	T	C	C	T	T	C	T	A	Cy01I
G	A	A	A	C	C	T	G	A	A	A	C	A	T	T	G	G	T	G	T	A	A	T	C	C	T	T	C	T	A	Cy02I
G	A	A	A	C	C	T	G	A	A	A	C	A	T	T	G	G	T	G	T	A	A	T	C	C	T	T	C	T	A	Cy03I
G	A	A	A	C	C	T	G	A	A	A	C	A	T	T	G	G	T	G	T	A	A	T	C	C	T	T	C	T	A	Cy04I
G	A	A	A	C	C	T	G	A	A	A	C	A	T	T	G	G	T	G	T	A	A	T	C	C	T	T	C	T	A	Cy05I
G	A	A	A	C	C	T	G	A	A	A	C	A	T	T	G	G	T	G	T	A	A	T	C	C	T	T	C	T	A	Cy06I
G	A	A	A	C	C	T	G	A	A	A	C	A	T	T	G	G	T	G	T	A	A	T	C	C	T	T	C	T	A	Cy07I
G	A	A	A	C	C	T	G	A	A	A	C	A	T	T	G	G	T	G	T	A	A	T	C	C	T	T	C	T	A	Cy08I
G	A	A	A	C	C	T	G	A	A	A	C	A	T	T	G	G	T	G	T	A	A	T	C	C	T	T	C	T	A	Cy09I
G	A	A	A	C	C	T	G	A	A	A	C	A	T	T	G	G	T	G	T	A	A	T	C	C	T	T	C	T	A	Cy10I
G	A	A	A	C	C	T	G	A	A	A	C	A	T	T	G	G	T	G	T	A	A	T	C	C	T	T	C	T	A	Cy01M
G	A	A	A	C	C	T	G	A	A	A	C	A	T	T	G	G	T	G	T	A	A	T	C	C	T	T	C	T	A	Cy02M
G	A	A	A	C	C	T	G	A	A	A	C	A	T	T	G	G	T	G	T	A	A	T	C	C	T	T	C	T	A	Cy03M
G	A	A	A	C	C	T	G	A	A	A	C	A	T	T	G	G	T	G	T	A	A	T	C	C	T	T	C	T	A	Cy04M
G	A	A	A	C	C	T	G	A	A	A	C	A	T	T	G	G	T	G	T	A	A	T	C	C	T	T	C	T	A	Cy05M
G	A	A	A	C	C	T	G	A	A	A	C	A	T	T	G	G	T	G	T	A	G	T	C	C	T	T	C	T	A	Cy06M
G	A	A	A	C	C	T	G	A	A	A	C	A	T	T	G	G	T	G	T	A	A	T	C	C	T	T	C	T	A	Cy07M
G	A	A	A	C	C	T	G	A	A	A	C	A	T	T	G	G	T	G	T	A	A	T	C	C	T	T	C	T	A	Cy08M
G	A	A	A	C	C	T	G	A	A	A	C	A	T	T	G	G	T	G	T	A	A	T	C	C	T	T	C	T	A	Cy09M
G	A	A	A	C	C	T	G	A	A	A	C	A	T	T	G	G	T	G	T	A	A	T	C	C	T	T	C	T	A	Cy10M



BCU IASI / CARAIMAN WEB LIBRARY

```
T G A G G C G C C A C A G T A A T C A C A A A C C T C C T A
                  430                 440                 450
T G A G G C G C C A C A G T A A T C A C A A A C C T C C T A  Cy01I
T G A G G C G C C A C A G T A A T C A C A A A C C T C C T A  Cy02I
T G A G G C G C C A C A G T A A T C A C A A A C C T C C T A  Cy03I
T G A G G C G C C A C A G T A A T C A C A A A C C T C C T A  Cy04I
T G A G G C G C C A C A G T A A T C A C A A A C C T C C T A  Cy05I
T G A G G C G C C A C A G T A A T C A C A A A C C T C C T A  Cy06I
T G A G G C G C C A C A G T A A T C A C A A A C C T C C T A  Cy07I
T G A G G C G C C A C A G T A A T C A C A A A C C T C C T A  Cy08I
T G A G G C G C C A C A G T A A T C A C A A A C C T C C T A  Cy09I
T G A G G C G C C A C A G T A A T C A C A A A C C T C C T A  Cy10I
T G A G G C G C C A C A G T A A T C A C A A A C C T C C T A  Cy01M
T G A G G C G C C A C A G T A A T C A C A A A C C T C C T A  Cy02M
T G A G G C G C C A C A G T A A T C A C A A A C C T C C T A  Cy03M
T G A G G C G C C A C A G T A A T C A C A A A C C T C C T A  Cy04M
T G A G G C G C C A C A G T A A T C A C A A A C C T C C T A  Cy05M
T G A G G C G C C A C A G T A A T C A C A A A C C T C C T A  Cy06M
T G A G G C G C C A C A G T A A T C A C A A A C C T C C T A  Cy07M
T G A G G C G C C A C A G T A A T C A C A A A C C T C C T A  Cy08M
T G A G G C G C C A C A G T A A T C A C A A A C C T C C T A  Cy09M
T G A G G C G C C A C A G T A A T C A C A A A C C T C C T A  Cy10M

T C T G C C G T A C C A T A C A T G G G A G A C A T G T T A
                  460                 470                 480
T C T G C C G T A C C A T A C A T G G G A G A C A T G T T A  Cy01I
T C T G C C G T A C C A T A C A T G G G A G A C A T G T T A  Cy02I
T C T G C C G T A C C A T A C A T G G G A G A C A T G T T A  Cy03I
T C T G C C G T A C C A T A C A T G G G A G A C A T G T T A  Cy04I
T C T G C C G T A C C A T A C A T G G G A G A C A T G T T A  Cy05I
T C T G C C G T A C C A T A C A T G G G A G A C A T G T T A  Cy06I
T C T G C C G T A C C A T A C A T G G G A G A C A T G T T A  Cy07I
T C T G C C G T A C C A T A C A T G G G A G A C A T G T T A  Cy08I
T C T G C C G T A C C A T A C A T G G G A G A C A T G T T A  Cy09I
T C T G C C G T A C C A T A C A T G G G A G A C A T G T T A  Cy10I
T C T G C C G T A C C A T A C A T G G G A G A C A T G T T A  Cy01M
T C T G C C G T A C C A T A C A T G G G A G A C A T G T T A  Cy02M
T C T G C C G T A C C A T A C A T G G G A G A C A T G T T A  Cy03M
T C T G C C G T A C C A T A C A T G G G A G A C A T G T T A  Cy04M
T C T G C C G T A C C A T A C A T G G G A G A C A T G T T A  Cy05M
T C T G C C G T A C C A T A C A T G G G A G A C A T G T T A  Cy06M
T C T G C C G T A C C A T A C A T G G G A G A C A T G T T A  Cy07M
T C T G C C G T A C C A T A C A T G G G A G A C A T G T T A  Cy08M
T C T G C C G T A C C A T A C A T G G G A G A C A T G T T A  Cy09M
T C T G C C G T A C C A T A C A T G G G A G A C A T G T T A  Cy10M
```

BCU IASI / CENTRUL DE RESURSE PENTRU BIBLIOTECARI

```
G T C C A A T G A A T C T G A G G T G G G T T C T C A G T A
                        490                 500                 510
G T C C A A T G A A T C T G A G G T G G G T T C T C A G T A  Cy01I
G T C C A A T G A A T C T G A G G T G G G T T C T C A G T A  Cy02I
G T C C A A T G A A T C T G A G G T G G G T T C T C A G T A  Cy03I
G T C C A A T G A A T C T G A G G T G G G T T C T C A G T A  Cy04I
G T C C A A T G A A T C T G A G G T G G G T T C T C A G T A  Cy05I
G T C C A A T G A A T C T G A G G T G G G T T C T C A G T A  Cy06I
G T C C A A T G A A T C T G A G G T G G G T T C T C A G T A  Cy07I
G T C C A A T G A A T C T G A G G T G G G T T C T C A G T A  Cy08I
G T C C A A T G A A T C T G A G G T G G G T T C T C A G T A  Cy09I
G T C C A A T G A A T C T G A G G T G G G T T C T C A G T A  Cy10I
G T C C A A T G A A T C T G A G G T G G G T T C T C A G T A  Cy01M
G T C C A A T G A A T C T G A G G T G G G T T C T C A G T A  Cy02M
G T C C A A T G A A T C T G A G G T G G G T T C T C A G T A  Cy03M
G T C C A A T G A A T C T G A G G T G G G T T C T C A G T A  Cy04M
G T C C A A T G A A T C T G A G G T G G G T T C T C A G T A  Cy05M
G T C C A A T G A A T C T G A G G T G G G T T C T C A G T A  Cy06M
G T C C A A T G A A T C T G A G G T G G G T T C T C A G T A  Cy07M
G T C C A A T G A A T C T G A G G T G G G T T C T C A G T A  Cy08M
G T C C A A T G A A T C T G A G G T G G G T T C T C A G T A  Cy09M
G T C C A A T G A A T C T G A G G T G G G T T C T C A G T A  Cy10M

G A C A A T G C A A C A C T A A C A C G A T T C T T C G C A
                        520                 530                 540
G A C A A T G C A A C A C T A A C A C G A T T C T T C G C A  Cy01I
G A C A A T G C A A C A C T A A C A C G A T T C T T C G C A  Cy02I
G A C A A T G C A A C A C T A A C A C G A T T C T T C G C A  Cy03I
G A C A A T G C A A C A C T A A C A C G A T T C T T C G C A  Cy04I
G A C A A T G C A A C A C T A A C A C G A T T C T T C G C A  Cy05I
G A C A A T G C A A C A C T A A C A C G A T T C T T C G C A  Cy06I
G A C A A T G C A A C A C T A A C A C G A T T C T T C G C A  Cy07I
G A C A A T G C A A C A C T A A C A C G A T T C T T C G C A  Cy08I
G A C A A T G C A A C A C T A A C A C G A T T C T T C G C A  Cy09I
G A C A A T G C A A C A C T A A C A C G A T T C T T C G C A  Cy10I
G A C A A T G C A A C A C T A A C A C G A T T C T T C G C A  Cy01M
G A C A A T G C A A C A C T A A C A C G A T T C T T C G C A  Cy02M
G A C A A T G C A A C A C T A A C A C G A T T C T T C G C A  Cy03M
G A C A A T G C A A C A C T A A C A C G A T T C T T C G C A  Cy04M
G A C A A T G C A A C A C T A A C A C G A T T C T T C G C A  Cy05M
G A C A A T G C A A C A C T A A C A C G A T T C T T C G C A  Cy06M
G A C A A T G C A A C A C T A A C A C G A T T C T T C G C A  Cy07M
G A C A A T G C A A C A C T A A C A C G A T T C T T C G C A  Cy08M
G A C A A T G C A A C A C T A A C A C G A T T C T T C G C A  Cy09M
G A C A A T G C A A C A C T A A C A C G A T T C T T C G C A  Cy10M
```

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

```
T T C C A C T T C C T A C T A C C A T T T G T T A T T A C C
                    550                 560                 570
T T C C A C T T C C T A C T A C C A T T T G T T A T T A C C  Cy01I
T T C C A C T T C C T A C T A C C A T T T G T T A T T A C C  Cy02I
T T C C A C T T C C T A C T A C C A T T T G T T A T T A C C  Cy03I
T T C C A C T T C C T A C T A C C A T T T G T T A T T A C C  Cy04I
T T C C A C T T C C T A C T A C C A T T T G T T A T T A C C  Cy05I
T T C C A C T T C C T A C T A C C A T T T G T T A T T A C C  Cy06I
T T C C A C T T C C T A C T A C C A T T T G T T A T T A C C  Cy07I
T T C C A C T T C C T A C T A C C A T T T G T T A T T A C C  Cy08I
T T C C A C T T C C T A C T A C C A T T T G T T A T T A C C  Cy09I
T T C C A C T T C C T A C T A C C A T T T G T T A T T A C C  Cy10I
T T C C A C T T C C T A C T A C C A T T T G T T A T T A C C  Cy01M
T T C C A C T T C C T A C T A C C A T T T G T T A T T A C C  Cy02M
T T C C A C T T C C T A C T A C C A T T T G T T A T T A C C  Cy03M
T T C C A C T T C C T A C T A C C A T T T G T T A T T A C C  Cy04M
T T C C A C T T C C T A C T A C C A T T T G T T A T T A C C  Cy05M
T T C C A C T T C C T A C T A C C A T T T G T T A T T A C C  Cy06M
T T C C A C T T C C T A C T A C C A T T T G T T A T T A C C  Cy07M
T T C C A C T T C C T A C T A C C A T T T G T T A T T A C C  Cy08M
T T C C A C T T C C T A C T A C C A T T T G T T A T T A C C  Cy09M
T T C C A C T T C C T A C T A C C A T T T G T T A T T A C C  Cy10M

G C C G C A A C C A T C A T C C A C C T G C T G T T C C T C
                    580                 590                 600
G C C G C A A C C A T C A T C C A C C T G C T G T T C C T C  Cy01I
G C C G C A A C C A T C A T C C A C C T G C T G T T C C T C  Cy02I
G C C G C A A C C A T C A T C C A C C T G C T G T T C C T C  Cy03I
G C C G C A A C C A T C A T C C A C C T G C T G T T C C T C  Cy04I
G C C G C A A C C A T C A T C C A C C T G C T G T T C C T C  Cy05I
G C C G C A A C C A T C A T C C A C C T G C T G T T C C T C  Cy06I
G C C G C A A C C A T C A T C C A C C T G C T G T T C C T C  Cy07I
G C C G C A A C C A T C A T C C A C C T G C T G T T C C T C  Cy08I
G C C G C A A C C A T C A T C C A C C T G C T G T T C C T C  Cy09I
G C C G C A A C C A T C A T C C A C C T G C T G T T C C T C  Cy10I
G C C G C A A C C A T C A T C C A C C T G C T G T T C C T C  Cy01M
G C C G C A A C C A T C A T C C A C C T G C T G T T C C T C  Cy02M
G C C G C A A C C A T C A T C C A C C T G C T G T T C C T C  Cy03M
G C C G C A A C C A T C A T C C A C C T G C T G T T C C T C  Cy04M
G C C G C A A C C A T C A T C C A C C T G C T G T T C C T C  Cy05M
G C C G C A A C C A T C A T C C A C C T A C T G T T C C T C  Cy06M
G C C G C A A C C A T C A T C C A C C T G C T G T T C C T C  Cy07M
G C C G C A A C C A T C A T C C A C C T G C T G T T C C T C  Cy08M
G C C G C A A C C A T C A T C C A C C T G C T G T T C C T C  Cy09M
G C C G C A A C C A T C A T C C A C C T G C T G T T C C T C  Cy10M
```

BCU IASI / CENTRUL UNIVERSITAR LIBRARY

```
C A C G A A A C A G G A T C A A A C A A A C C C A A T C G G A
                        610                 620                 630
C A C G A A A C A G G A T C A A A C A A A C C C A A T C G G A  Cy01I
C A C G A A A C A G G A T C A A A C A A A C C C A A T C G G A  Cy02I
C A C G A A A C A G G A T C A A A C A A A C C C A A T C G G A  Cy03I
C A C G A A A C A G G A T C A A A C A A A C C C A A T C G G A  Cy04I
C A C G A A A C A G G A T C A A A C A A A C C C A A T C G G A  Cy05I
C A C G A A A C A G G A T C A A A C A A A C C C A A T C G G A  Cy06I
C A C G A A A C A G G A T C A A A C A A A C C C A A T C G G A  Cy07I
C A C G A A A C A G G A T C A A A C A A A C C C A A T C G G A  Cy08I
C A C G A A A C A G G A T C A A A C A A A C C C A A T C G G A  Cy09I
C A C G A A A C A G G A T C A A A C A A A C C C A A T C G G A  Cy10I
C A C G A A A C A G G A T C A A A C A A A C C C A A T C G G A  Cy01M
C A C G A A A C A G G A T C A A A C A A A C C C A A T C G G A  Cy02M
C A C G A A A C A G G A T C A A A C A A A C C C A A T C G G A  Cy03M
C A C G A A A C A G G A T C A A A C A A A C C C A A T C G G A  Cy04M
C A C G A A A C A G G A T C A A A C A A A C C C A A T C G G A  Cy05M
C A C G A A A C A G G A T C A A A C A A A C C C G A T C G G A  Cy06M
C A C G A A A C A G G A T C A A A C A A A C C C A A T C G G A  Cy07M
C A C G A A A C A G G A T C A A A C A A A C C C A A T C G G A  Cy08M
C A C G A A A C A G G A T C A A A C A A A C C C A A T C G G A  Cy09M
C A C G A A A C A G G A T C A A A C A A A C C C A A T C G G A  Cy10M

C T A A A C T C A G A C G C A G A C A A A G T C T C T T T C
                        640                 650                 660
C T A A A C T C A G A C G C A G A C A A A G T C T C T T T C  Cy01I
C T A A A C T C A G A C G C A G A C A A A G T C T C T T T C  Cy02I
C T A A A C T C A G A C G C A G A C A A A G T C T C T T T C  Cy03I
C T A A A C T C A G A C G C A G A C A A A G T C T C T T T C  Cy04I
C T A A A C T C A G A C G C A G A C A A A G T C T C T T T C  Cy05I
C T A A A C T C A G A C G C A G A C A A A G T C T C T T T C  Cy06I
C T A A A C T C A G A C G C A G A C A A A G T C T C T T T C  Cy07I
C T A A A C T C A G A C G C A G A C A A A G T C T C T T T C  Cy08I
C T A A A C T C A G A C G C A G A C A A A G T C T C T T T C  Cy09I
C T A A A C T C A G A C G C A G A C A A A G T C T C T T T C  Cy10I
C T A A A C T C A G A C G C A G A C A A A G T C T C T T T C  Cy01M
C T A A A C T C A G A C G C A G A C A A A G T C T C T T T C  Cy02M
C T A A A C T C A G A C G C A G A C A A A G T C T C T T T C  Cy03M
C T A A A C T C A G A C G C A G A C A A A G T C T C T T T C  Cy04M
C T A A A C T C A G A C G C A G A C A A A G T C T C T T T C  Cy05M
C T A A A C T C A G A C G C A G A C A A A G T C T C T T T C  Cy06M
C T A A A C T C A G A C G C A G A C A A A G T C T C T T T C  Cy07M
C T A A A C T C A G A C G C A G A C A A A G T C T C T T T C  Cy08M
C T A A A C T C A G A C G C A G A C A A A G T C T C T T T C  Cy09M
C T A A A C T C A G A C G C A G A C A A A G T C T C T T T C  Cy10M
```

BCU IASI / CENTRUL UNIVERSITAR LIBRARY

```
C A C C C G T A C T T C T C A T A C A A A G A C C T C C T T
                    670                 680                 690
C A C C C G T A C T T C T C A T A C A A A G A C C T C C T T  Cy01I
C A C C C G T A C T T C T C A T A C A A A G A C C T C C T T  Cy02I
C A C C C G T A C T T C T C A T A C A A A G A C C T C C T T  Cy03I
C A C C C G T A C T T C T C A T A C A A A G A C C T C C T T  Cy04I
C A C C C G T A C T T C T C A T A C A A A G A C C T C C T T  Cy05I
C A C C C G T A C T T C T C A T A C A A A G A C C T C C T T  Cy06I
C A C C C G T A C T T C T C A T A C A A A G A C C T C C T T  Cy07I
C A C C C G T A C T T C T C A T A C A A A G A C C T C C T T  Cy08I
C A C C C G T A C T T C T C A T A C A A A G A C C T C C T T  Cy09I
C A C C C G T A C T T C T C A T A C A A A G A C C T C C T T  Cy10I
C A C C C G T A C T T C T C A T A C A A A G A C C T C C T T  Cy01M
C A C C C G T A C T T C T C A T A C A A A G A C C T C C T T  Cy02M
C A C C C G T A C T T C T C A T A C A A A G A C C T C C T T  Cy03M
C A C C C G T A C T T C T C A T A C A A A G A C C T C C T T  Cy04M
C A C C C G T A C T T C T C A T A C A A A G A C C T C C T T  Cy05M
C A C C C G T A C T T C T C A T A C A A A G A C C T C C T T  Cy06M
C A C C C G T A C T T C T C A T A C A A A G A C C T C C T T  Cy07M
C A C C C G T A C T T C T C A T A C A A A G A C C T C C T T  Cy08M
C A C C C G T A C T T C T C A T A C A A A G A C C T C C T T  Cy09M
C A C C C G T A C T T C T C A T A C A A A G A C C T C C T T  Cy10M

G G A T T C G T A A T T A T A C T C C T A G C T C T T A C A
                    700                 710                 720
G G A T T C G T A A T T A T A C T C C T A G C T C T T A C A  Cy01I
G G A T T C G T A A T T A T A C T C C T A G C T C T T A C A  Cy02I
G G A T T C G T A A T T A T A C T C C T A G C T C T T A C A  Cy03I
G G A T T C G T A A T T A T A C T C C T A G C T C T T A C A  Cy04I
G G A T T C G T A A T T A T A C T C C T A G C T C T T A C A  Cy05I
G G A T T C G T A A T T A T A C T C C T A G C T C T T A C A  Cy06I
G G A T T C G T A A T T A T A C T C C T A G C T C T T A C A  Cy07I
G G A T T C G T A A T T A T A C T C C T A G C T C T T A C A  Cy08I
G G A T T C G T A A T T A T A C T C C T A G C T C T T A C A  Cy09I
G G A T T C G T A A T T A T A C T C C T A G C T C T T A C A  Cy10I
G G A T T C G T A A T T A T A C T C C T A G C T C T T A C A  Cy01M
G G A T T C G T A A T T A T A C T C C T A G C T C T T A C A  Cy02M
G G A T T C G T A A T T A T A C T C C T A G C T C T T A C A  Cy03M
G G A T T C G T A A T T A T A C T C C T A G C T C T T A C A  Cy04M
G G A T T C G T A A T T A T A C T C C T A G C T C T T A C A  Cy05M
G G G T T C G T A A T T A T A C T C C T A G C T C T T A C A  Cy06M
G G A T T C G T A A T T A T A C T C C T A G C T C T T A C A  Cy07M
G G A T T C G T A A T T A T A C T C C T A G C T C T T A C A  Cy08M
G G A T T C G T A A T T A T A C T C C T A G C T C T T A C A  Cy09M
G G A T T C G T A A T T A T A C T C C T A G C T C T T A C A  Cy10M
```

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

```
C T A C T A G C A C T G T T C T C C C C T A A C T T A C T A
                    730                 740                 750
C T A C T A G C A C T G T T C T C C C C T A A C T T A C T A  Cy01I
C T A C T A G C A C T G T T C T C C C C T A A C T T A C T A  Cy02I
C T A C T A G C A C T G T T C T C C C C T A A C T T A C T A  Cy03I
C T A C T A G C A C T G T T C T C C C C T A A C T T A C T A  Cy04I
C T A C T A G C A C T G T T C T C C C C T A A C T T A C T A  Cy05I
C T A C T A G C A C T G T T C T C C C C T A A C T T A C T A  Cy06I
C T A C T A G C A C T G T T C T C C C C T A A C T T A C T A  Cy07I
C T A C T A G C A C T G T T C T C C C C T A A C T T A C T A  Cy08I
C T A C T A G C A C T G T T C T C C C C T A A C T T A C T A  Cy09I
C T A C T A G C A C T G T T C T C C C C T A A C T T A C T A  Cy10I
C T A C T A G C A C T G T T C T C C C C T A A C T T A C T A  Cy01M
C T A C T A G C A C T G T T C T C C C C T A A C T T A C T A  Cy02M
C T A C T A G C A C T G T T C T C C C C T A A C T T A C T A  Cy03M
C T A C T A G C A C T G T T C T C C C C T A A C T T A C T A  Cy04M
C T A C T A G C A C T G T T C T C C C C T A A C T T A C T A  Cy05M
C T A C T A G C A C T A T T C T C C C C T A A C T T A C T A  Cy06M
C T A C T A G C A C T G T T C T C C C C T A A C T T A C T A  Cy07M
C T A C T A G C A C T G T T C T C C C C T A A C T T A C T A  Cy08M
C T A C T A G C A C T G T T C T C C C C T A A C T T A C T A  Cy09M
C T A C T A G C A C T G T T C T C C C C T A A C T T A C T A  Cy10M

G G A G A C C C A G A A A A C T T C A C C C C G C A A A C
                    760                 770                 780
G G A G A C C C A G A A A A C T T C A C C C C G C A A A C  Cy01I
G G A G A C C C A G A A A A C T T C A C C C C G C A A A C  Cy02I
G G A G A C C C A G A A A A C T T C A C C C C G C A A A C  Cy03I
G G A G A C C C A G A A A A C T T C A C C C C G C A A A C  Cy04I
G G A G A C C C A G A A A A C T T C A C C C C G C A A A C  Cy05I
G G A G A C C C A G A A A A C T T C A C C C C G C A A A C  Cy06I
G G A G A C C C A G A A A A C T T C A C C C C G C A A A C  Cy07I
G G A G A C C C A G A A A A C T T C A C C C C G C A A A C  Cy08I
G G A G A C C C A G A A A A C T T C A C C C C G C A A A C  Cy09I
G G A G A C C C A G A A A A C T T C A C C C C G C A A A C  Cy10I
G G A G A C C C A G A A A A C T T C A C C C C G C A A A C  Cy01M
G G A G A C C C A G A A A A C T T C A C C C C G C A A A C  Cy02M
G G A G A C C C A G A A A A C T T C A C C C C G C A A A C  Cy03M
G G A G A C C C A G A A A A C T T C A C C C C G C A A A C  Cy04M
G G A G A C C C A G A A A A C T T C A C C C C G C A A A C  Cy05M
G G A G A C C C A G A A A A C T T C A C C C C G C A A A C  Cy06M
G G A G A C C C A G A A A A C T T C A C C C C G C A A A C  Cy07M
G G A G A C C C A G A A A A C T T C A C C C C G C A A A C  Cy08M
G G A G A C C C A G A A A A C T T C A C C C C G C A A A C  Cy09M
G G A G A C C C A G A A A A C T T C A C C C C G C A A A C  Cy10M
```

BCU IASI / CENTRUL UNIVERSITAR LIBRARY

```
C C T C T A G T T A C A C C A C C C C A C A T C A A A C C A
                    790                     800                     810
C C T C T A G T T A C A C C A C C C C A C A T C A A A C C A   Cy01I
C C T C T A G T T A C A C C A C C C C A C A T C A A A C C A   Cy02I
C C T C T A G T T A C A C C A C C C C A C A T C A A A C C A   Cy03I
C C T C T A G T T A C A C C A C C C C A C A T C A A A C C A   Cy04I
C C T C T A G T T A C A C C A C C C C A C A T C A A A C C A   Cy05I
C C T C T A G T T A C A C C A C C C C A C A T C A A A C C A   Cy06I
C C T C T A G T T A C A C C A C C C C A C A T C A A A C C A   Cy07I
C C T C T A G T T A C A C C A C C C C A C A T C A A A C C A   Cy08I
C C T C T A G T T A C A C C A C C C C A C A T C A A A C C A   Cy09I
C C T C T A G T T A C A C C A C C C C A C A T C A A A C C A   Cy10I
C C T C T A G T T A C A C C A C C C C A C A T C A A A C C A   Cy01M
C C T C T A G T T A C A C C A C C C C A C A T C A A A C C A   Cy02M
C C T C T A G T T A C A C C A C C C C A C A T C A A A C C A   Cy03M
C C T C T A G T T A C A C C A C C C C A C A T C A A A C C A   Cy04M
C C T C T A G T T A C A C C A C C C C A C A T C A A A C C A   Cy05M
C C T C T A G T T A C A C C A C C C C A C A T C A A A C C A   Cy06M
C C T C T A G T T A C A C C A C C C C A C A T C A A A C C A   Cy07M
C C T C T A G T T A C A C C A C C C C A C A T C A A A C C A   Cy08M
C C T C T A G T T A C A C C A C C C C A C A T C A A A C C A   Cy09M
C C T C T A G T T A C A C C A C C C C A C A T C A A A C C A   Cy10M

G A A T G A T A C T T C C T A T T T G C C T A C G C C A T C
                    820                     830                     840
G A A T G A T A C T T C C T A T T T G C C T A C G C C A T C   Cy01I
G A A T G A T A C T T C C T A T T T G C C T A C G C C A T C   Cy02I
G A A T G A T A C T T C C T A T T T G C C T A C G C C A T C   Cy03I
G A A T G A T A C T T C C T A T T T G C C T A C G C C A T C   Cy04I
G A A T G A T A C T T C C T A T T T G C C T A C G C C A T C   Cy05I
G A A T G A T A C T T C C T A T T T G C C T A C G C C A T C   Cy06I
G A A T G A T A C T T C C T A T T T G C C T A C G C C A T C   Cy07I
G A A T G A T A C T T C C T A T T T G C C T A C G C C A T C   Cy08I
G A A T G A T A C T T C C T A T T T G C C T A C G C C A T C   Cy09I
G A A T G A T A C T T C C T A T T T G C C T A C G C C A T C   Cy10I
G A A T G A T A C T T C C T A T T T G C C T A C G C C A T C   Cy01M
G A A T G A T A C T T C C T A T T T G C C T A C G C C A T C   Cy02M
G A A T G A T A C T T C C T A T T T G C C T A C G C C A T C   Cy03M
G A A T G A T A C T T C C T A T T T G C C T A C G C C A T C   Cy04M
G A A T G A T A C T T C C T A T T T G C C T A C G C C A T C   Cy05M
G A A T G A T A C T T C C T A T T T G C C T A C G C C A T C   Cy06M
G A A T G A T A C T T C C T A T T T G C C T A C G C C A T C   Cy07M
G A A T G A T A C T T C C T A T T T G C C T A C G C C A T C   Cy08M
G A A T G A T A C T T C C T A T T T G C C T A C G C C A T C   Cy09M
G A A T G A T A C T T C C T A T T T G C C T A C G C C A T C   Cy10M
```

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

```
C T A C G A T C A A T T C C A A A C A A A C T T G G A G G T
                        850                 860                 870
C T A C G A T C A A T T C C A A A C A A A C T T G G A G G T  Cy01I
C T A C G A T C A A T T C C A A A C A A A C T T G G A G G T  Cy02I
C T A C G A T C A A T T C C A A A C A A A C T T G G A G G T  Cy03I
C T A C G A T C A A T T C C A A A C A A A C T T G G A G G T  Cy04I
C T A C G A T C A A T T C C A A A C A A A C T T G G A G G T  Cy05I
C T A C G A T C A A T T C C A A A C A A A C T T G G A G G T  Cy06I
C T A C G A T C A A T T C C A A A C A A A C T T G G A G G T  Cy07I
C T A C G A T C A A T T C C A A A C A A A C T T G G A G G T  Cy08I
C T A C G A T C A A T T C C A A A C A A A C T T G G A G G T  Cy09I
C T A C G A T C A A T T C C A A A C A A A C T T G G A G G T  Cy10I
C T A C G A T C A A T T C C A A A C A A A C T T G G A G G T  Cy01M
C T A C G A T C A A T T C C A A A C A A A C T T G G A G G T  Cy02M
C T A C G A T C A A T T C C A A A C A A A C T T G G A G G T  Cy03M
C T A C G A T C A A T T C C A A A C A A A C T T G G A G G T  Cy04M
C T A C G A T C A A T T C C A A A C A A A C T T G G A G G T  Cy05M
C T A C G A T C A A T T C C A A A C A A A C T C G G A G G A  Cy06M
C T A C G A T C A A T T C C A A A C A A A C T T G G A G G T  Cy07M
C T A C G A T C A A T T C C A A A C A A A C T T G G A G G T  Cy08M
C T A C G A T C A A T T C C A A A C A A A C T T G G A G G T  Cy09M
C T A C G A T C A A T T C C A A A C A A A C T T G G A G G T  Cy10M

G T C C T T G C A C T C C T A T T C T C C A T T C T A G T A
                        880                 890                 900
G T C C T T G C A C T C C T A T T C T C C A T T C T A G T A  Cy01I
G T C C T T G C A C T C C T A T T C T C C A T T C T A G T A  Cy02I
G T C C T T G C A C T C C T A T T C T C C A T T C T A G T A  Cy03I
G T C C T T G C A C T C C T A T T C T C C A T T C T A G T A  Cy04I
G T C C T T G C A C T C C T A T T C T C C A T T C T A G T A  Cy05I
G T C C T T G C A C T C C T A T T C T C C A T T C T A G T A  Cy06I
G T C C T T G C A C T C C T A T T C T C C A T T C T A G T A  Cy07I
G T C C T T G C A C T C C T A T T C T C C A T T C T A G T A  Cy08I
G T C C T T G C A C T C C T A T T C T C C A T T C T A G T A  Cy09I
G T C C T T G C A C T C C T A T T C T C C A T T C T A G T A  Cy10I
G T C C T T G C A C T C C T A T T C T C C A T T C T A G T A  Cy01M
G T C C T T G C A C T C C T A T T C T C C A T T C T A G T A  Cy02M
G T C C T T G C A C T C C T A T T C T C C A T T C T A G T A  Cy03M
G T C C T T G C A C T C C T A T T C T C C A T T C T A G T A  Cy04M
G T C C T T G C A C T C C T A T T C T C C A T T C T A G T A  Cy05M
G T C C T T G C A C T C C T A T T C T C C A T T C T G G T A  Cy06M
G T C C T T G C A C T C C T A T T C T C C A T T C T A G T A  Cy07M
G T C C T T G C A C T C C T A T T C T C C A T T C T A G T A  Cy08M
G T C C T T G C A C T C C T A T T C T C C A T T C T A G T A  Cy09M
G T C C T T G C A C T C C T A T T C T C C A T T C T A G T A  Cy10M
```

BCU IASI / CENTRUL UNIVERSITAR

Secvență	
T T A A T A G T A G T A C C A C T A C T A C A C A C C T C A	
910 920 930	
T T A A T A G T A G T A C C A C T A C T A C A C A C C T C A	Cy01I
T T A A T A G T A G T A C C A C T A C T A C A C A C C T C A	Cy02I
T T A A T A G T A G T A C C A C T A C T A C A C A C C T C A	Cy03I
T T A A T A G T A G T A C C A C T A C T A C A C A C C T C A	Cy04I
T T A A T A G T A G T A C C A C T A C T A C A C A C C T C A	Cy05I
T T A A T A G T A G T A C C A C T A C T A C A C A C C T C A	Cy06I
T T A A T A G T A G T A C C A C T A C T A C A C A C C T C A	Cy07I
T T A A T A G T A G T A C C A C T A C T A C A C A C C T C A	Cy08I
T T A A T A G T A G T A C C A C T A C T A C A C A C C T C A	Cy09I
T T A A T A G T A G T A C C A C T A C T A C A C A C C T C A	Cy10I
T T A A T A G T A G T A C C A C T A C T A C A C A C C T C A	Cy01M
T T A A T A G T A G T A C C A C T A C T A C A C A C C T C A	Cy02M
T T A A T A G T A G T A C C A C T A C T A C A C A C C T C A	Cy03M
T T A A T A G T A G T A C C A C T A C T A C A C A C C T C A	Cy04M
T T A A T A G T A G T A C C A C T A C T A C A C A C C T C A	Cy05M
T T A A T A G T A G T A C C A C T A C T A C A C A C C T C A	Cy06M
T T A A T A G T A G T A C C A C T A C T A C A C A C C T C A	Cy07M
T T A A T A G T A G T A C C A C T A C T A C A C A C C T C A	Cy08M
T T A A T A G T A G T A C C A C T A C T A C A C A C C T C A	Cy09M
T T A A T A G T A G T A C C A C T A C T A C A C A C C T C A	Cy10M

Secvență	
A A A C A A C G A G G A C T A A C A T T C C G C C C C A T C	
940 950 960	
A A A C A A C G A G G A C T A A C A T T C C G C C C C A T C	Cy01I
A A A C A A C G A G G A C T A A C A T T C C G C C C C A T C	Cy02I
A A A C A A C G A G G A C T A A C A T T C C G C C C C A T C	Cy03I
A A A C A A C G A G G A C T A A C A T T C C G C C C C A T C	Cy04I
A A A C A A C G A G G A C T A A C A T T C C G C C C C A T C	Cy05I
A A A C A A C G A G G A C T A A C A T T C C G C C C C A T C	Cy06I
A A A C A A C G A G G A C T A A C A T T C C G C C C C A T C	Cy07I
A A A C A A C G A G G A C T A A C A T T C C G C C C C A T C	Cy08I
A A A C A A C G A G G A C T A A C A T T C C G C C C C A T C	Cy09I
A A A C A A C G A G G A C T A A C A T T C C G C C C C A T C	Cy10I
A A A C A A C G A G G A C T A A C A T T C C G C C C C A T C	Cy01M
A A A C A A C G A G G A C T A A C A T T C C G C C C C A T C	Cy02M
A A A C A A C G A G G A C T A A C A T T C C G C C C C A T C	Cy03M
A A A C A A C G A G G A C T A A C A T T C C G C C C C A T C	Cy04M
A A A C A A C G A G G A C T A A C A T T C C G C C C C A T C	Cy05M
A A A C A A C G A G G A C T A A C A T T C C G C C C C A T C	Cy06M
A A A C A A C G A G G A C T A A C A T T C C G C C C C A T C	Cy07M
A A A C A A C G A G G A C T A A C A T T C C G C C C C A T C	Cy08M
A A A C A A C G A G G A C T A A C A T T C C G C C C C A T C	Cy09M
A A A C A A C G A G G A C T A A C A T T C C G C C C C A T C	Cy10M

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

```
A C C C A A T T C C T A T T C T G A A C C C T A G T A G C A
                    970                 980                 990
A C C C A A T T C C T A T T C T G A A C C C T A G T A G C A  Cy01I
A C C C A A T T C C T A T T C T G A A C C C T A G T A G C A  Cy02I
A C C C A A T T C C T A T T C T G A A C C C T A G T A G C A  Cy03I
A C C C A A T T C C T A T T C T G A A C C C T A G T A G C A  Cy04I
A C C C A A T T C C T A T T C T G A A C C C T A G T A G C A  Cy05I
A C C C A A T T C C T A T T C T G A A C C C T A G T A G C A  Cy06I
A C C C A A T T C C T A T T C T G A A C C C T A G T A G C A  Cy07I
A C C C A A T T C C T A T T C T G A A C C C T A G T A G C A  Cy08I
A C C C A A T T C C T A T T C T G A A C C C T A G T A G C A  Cy09I
A C C C A A T T C C T A T T C T G A A C C C T A G T A G C A  Cy10I
A C C C A A T T C C T A T T C T G A A C C C T A G T A G C A  Cy01M
A C C C A A T T C C T A T T C T G A A C C C T A G T A G C A  Cy02M
A C C C A A T T C C T A T T C T G A A C C C T A G T A G C A  Cy03M
A C C C A A T T C C T A T T C T G A A C C C T A G T A G C A  Cy04M
A C C C A A T T C C T A T T C T G A A C C C T A G T A G C A  Cy05M
A C C C A A T T C C T A T T C T G A A C C C T A G T A G C G  Cy06M
A C C C A A T T C C T A T T C T G A A C C C T A G T A G C A  Cy07M
A C C C A A T T C C T A T T C T G A A C C C T A G T A G C A  Cy08M
A C C C A A T T C C T A T T C T G A A C C C T A G T A G C A  Cy09M
A C C C A A T T C C T A T T C T G A A C C C T A G T A G C A  Cy10M

G A C A T A A T T A T C C T A A C A T G A A T T G G A G G C
                    1000                1010                1020
G A C A T A A T T A T C C T A A C A T G A A T T G G A G G C  Cy01I
G A C A T A A T T A T C C T A A C A T G A A T T G G A G G C  Cy02I
G A C A T A A T T A T C C T A A C A T G A A T T G G A G G C  Cy03I
G A C A T A A T T A T C C T A A C A T G A A T T G G A G G C  Cy04I
G A C A T A A T T A T C C T A A C A T G A A T T G G A G G C  Cy05I
G A C A T A A T T A T C C T A A C A T G A A T T G G A G G C  Cy06I
G A C A T A A T T A T C C T A A C A T G A A T T G G A G G C  Cy07I
G A C A T A A T T A T C C T A A C A T G A A T T G G A G G C  Cy08I
G A C A T A A T T A T C C T A A C A T G A A T T G G A G G C  Cy09I
G A C A T A A T T A T C C T A A C A T G A A T T G G A G G C  Cy10I
G A C A T A A T T A T C C T A A C A T G A A T T G G A G G C  Cy01M
G A C A T A A T T A T C C T A A C A T G A A T T G G A G G C  Cy02M
G A C A T A A T T A T C C T A A C A T G A A T T G G A G G C  Cy03M
G A C A T A A T T A T C C T A A C A T G A A T T G G A G G C  Cy04M
G A C A T A A T T A T C C T A A C A T G A A T T G G A G G C  Cy05M
G A C A T A A T T A T C C T A A C A T G A A T T G G A G G C  Cy06M
G A C A T A A T T A T C C T A A C A T G A A T T G G A G G C  Cy07M
G A C A T A A T T A T C C T A A C A T G A A T T G G A G G C  Cy08M
G A C A T A A T T A T C C T A A C A T G A A T T G G A G G C  Cy09M
G A C A T A A T T A T C C T A A C A T G A A T T G G A G G C  Cy10M
```

BCU IASI / CENTRUL UNIVERSITAR BIBLIOTECA

```
A T A C C A G T A G A A C A T C T C A T C A T A T G A C A T
                    1030                    1040                    1050
A T A C C A G T A G A A C A T C T C A T C A T A T G A C A T   Cy01I
A T A C C A G T A G A A C A T C T C A T C A T A T G A C A T   Cy02I
A T A C C A G T A G A A C A T C T C A T C A T A T G A C A T   Cy03I
A T A C C A G T A G A A C A T C T C A T C A T A T G A C A T   Cy04I
A T A C C A G T A G A A C A T C T C A T C A T A T G A C A T   Cy05I
A T A C C A G T A G A A C A T C T C A T C A T A T G A C A T   Cy06I
A T A C C A G T A G A A C A T C T C A T C A T A T G A C A T   Cy07I
A T A C C A G T A G A A C A T C T C A T C A T A T G A C A T   Cy08I
A T A C C A G T A G A A C A T C T C A T C A T A T G A C A T   Cy09I
A T A C C A G T A G A A C A T C T C A T C A T A T G A C A T   Cy10I
A T A C C A G T A G A A C A T C T C A T C A T A T G A C A T   Cy01M
A T A C C A G T A G A A C A T C T C A T C A T A T G A C A T   Cy02M
A T A C C A G T A G A A C A T C T C A T C A T A T G A C A T   Cy03M
A T A C C A G T A G A A C A T C T C A T C A T A T G A C A T   Cy04M
A T A C C A G T A G A A C A T C T C A T C A T A T G A C A T   Cy05M
A T A C C A G T A G A A C A T C T C A T C A T A T G A C A T   Cy06M
A T A C C A G T A G A A C A T C T C A T C A T A T G A C A T   Cy07M
A T A C C A G T A G A A C A T C T C A T C A T A T G A C A T   Cy08M
A T A C C A G T A G A A C A T C T C A T C A T A T G A C A T   Cy09M
A T A C C A G T A G A A C A T C T C A T C A T A T G A C A T   Cy10M

G C A T C G T C A T A C T C G C C A C A T T C T C A T T A T
                    1060                    1070                    1080
G C A T C G T C A T A C T C G C C A C A T T C T C A T T A T   Cy01I
G C A T C G T C A T A C T C G C C A C A T T C T C A T T A T   Cy02I
G C A T C G T C A T A C T C G C C A C A T T C T C A T T A T   Cy03I
G C A T C G T C A T A C T C G C C A C A T T C T C A T T A T   Cy04I
G C A T C G T C A T A C T C G C C A C A T T C T C A T T A T   Cy05I
G C A T C G T C A T A C T C G C C A C A T T C T C A T T A T   Cy06I
G C A T C G T C A T A C T C G C C A C A T T C T C A T T A T   Cy07I
G C A T C G T C A T A C T C G C C A C A T T C T C A T T A T   Cy08I
G C A T C G T C A T A C T C G C C A C A T T C T C A T T A T   Cy09I
G C A T C G T C A T A C T C G C C A C A T T C T C A T T A T   Cy10I
G C A T C G T C A T A C T C G C C A C A T T C T C A T T A T   Cy01M
G C A T C G T C A T A C T C G C C A C A T T C T C A T T A T   Cy02M
G C A T C G T C A T A C T C G C C A C A T T C T C A T T A T   Cy03M
G C A T C G T C A T A C T C G C C A C A T T C T C A T T A T   Cy04M
G C A T C G T C A T A C T C G C C A C A T T C T C A T T A T   Cy05M
G C A T C G T C A T A C T C G C C A C A T T C T C A T T A T   Cy06M
G C A T C G T C A T A C T C G C C A C A T T C T C A T T A T   Cy07M
G C A T C G T C A T A C T C G C C A C A T T C T C A T T A T   Cy08M
G C A T C G T C A T A C T C G C C A C A T T C T C A T T A T   Cy09M
G C A T C G T C A T A C T C G C C A C A T T C T C A T T A T   Cy10M
```

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

```
G C A T A G C G A T G T A G A A T A G C T A T G A C T G C T
                    1090                    1100                    1110
G C A T A G C G A T G T A G A A T A G C T A T G A C T G C T   Cy01I
G C A T A G C G A T G T A G A A T A G C T A T G A C T G C T   Cy02I
G C A T A G C G A T G T A G A A T A G C T A T G A C T G C T   Cy03I
G C A T A G C G A T G T A G A A T A G C T A T G A C T G C T   Cy04I
G C A T A G C G A T G T A G A A T A G C T A T G A C T G C T   Cy05I
G C A T A G C G A T G T A G A A T A G C T A T G A C T G C T   Cy06I
G C A T A G C G A T G T A G A A T A G C T A T G A C T G C T   Cy07I
G C A T A G C G A T G T A G A A T A G C T A T G A C T G C T   Cy08I
G C A T A G C G A T G T A G A A T A G C T A T G A C T G C T   Cy09I
G C A T A G C G A T G T A G A A T A G C T A T G A C T G C T   Cy10I
G C A T A G C G A T G T A G A A T A G C T A T G A C T G C T   Cy01M
G C A T A G C G A T G T A G A A T A G C T A T G A C T G C T   Cy02M
G C A T A G C G A T G T A G A A T A G C T A T G A C T G C T   Cy03M
G C A T A G C G A T G T A G A A T A G C T A T G A C T G C T   Cy04M
G C A T A G C G A T G T A G A A T A G C T A T G A C T G C T   Cy05M
G C A T A G C G A T G T A G A A T A G C T A T G A C T G C T   Cy06M
G C A T A G C G A T G T A G A A T A G C T A T G A C T G C T   Cy07M
G C A T A G C G A T G T A G A A T A G C T A T G A C T G C T   Cy08M
G C A T A G C G A T G T A G A A T A G C T A T G A C T G C T   Cy09M
G C A T A G C G A T G T A G A A T A G C T A T G A C T G C T   Cy10M

A T A C T A C A A A A T A A A G C A C T A A A A T G A G C T
                    1120                    1130                    1140
A T A C T A C A A A A T A A A G C A C T A A A A T G A G C T   Cy01I
A T A C T A C A A A A T A A A G C A C T A A A A T G A G C T   Cy02I
A T A C T A C A A A A T A A A G C A C T A A A A T G A G C T   Cy03I
A T A C T A C A A A A T A A A G C A C T A A A A T G A G C T   Cy04I
A T A C T A C A A A A T A A A G C A C T A A A A T G A G C T   Cy05I
A T A C T A C A A A A T A A A G C A C T A A A A T G A G C T   Cy06I
A T A C T A C A A A A T A A A G C A C T A A A A T G A G C T   Cy07I
A T A C T A C A A A A T A A A G C A C T A A A A T G A G C T   Cy08I
A T A C T A C A A A A T A A A G C A C T A A A A T G A G C T   Cy09I
A T A C T A C A A A A T A A A G C A C T A A A A T G A G C T   Cy10I
A T A C T A C A A A A T A A A G C A C T A A A A T G A G C T   Cy01M
A T A C T A C A A A A T A A A G C A C T A A A A T G A G C T   Cy02M
A T A C T A C A A A A T A A A G C A C T A A A A T G A G C T   Cy03M
A T A C T A C A A A A T A A A G C A C T A A A A T G A G C T   Cy04M
A T A C T A C A A A A T A A A G C A C T A A A A T G A G C T   Cy05M
A T A C T A C A A A A T A A A G C A C T A A A A T G A G C T   Cy06M
A T A C T A C A A A A T A A A G C A C T A A A A T G A G C T   Cy07M
A T A C T A C A A A A T A A A G C A C T A A A A T G A G C T   Cy08M
A T A C T A C A A A A T A A A G C A C T A A A A T G A G C T   Cy09M
A T A C T A C A A A A T A A A G C A C T A A A A T G A G C T   Cy10M
```

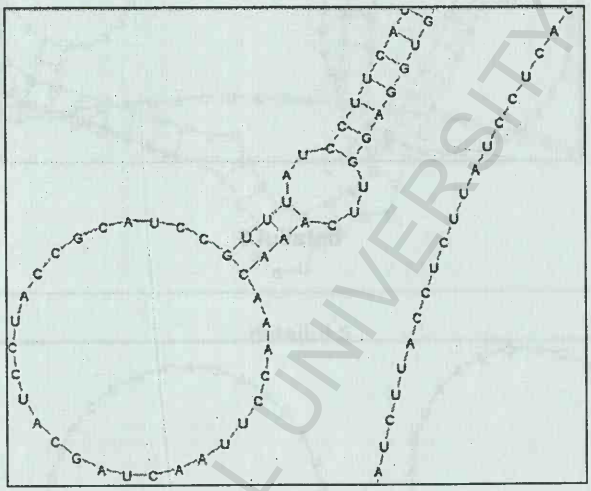
BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

(Cy01I=*Cyprinus carpio* populația Iaşi, Cy01M= *Cyprinus carpio*, populația Movileni)

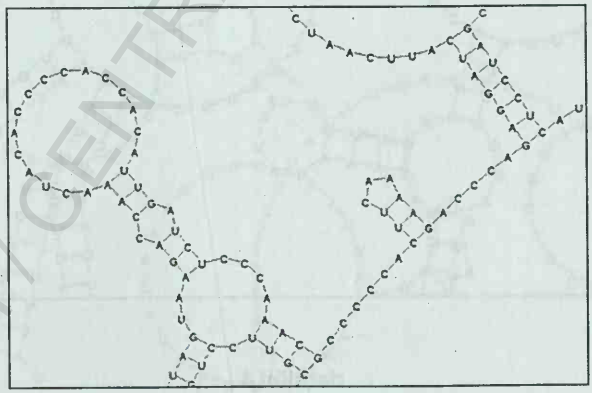
BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

ANEXA 2

MODELAREA STRUCTURII SECUNDARE A ARNM PENTRU HAPLOTIPUL CY01I AL CITOCROMULUI B, LA SPECIA *CYPRINUS CARPIO* L.

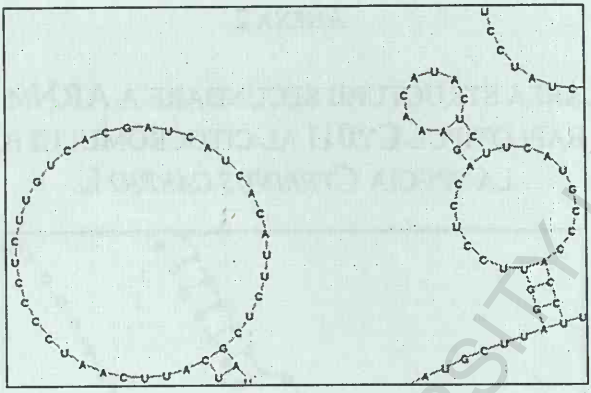


detaliul 1

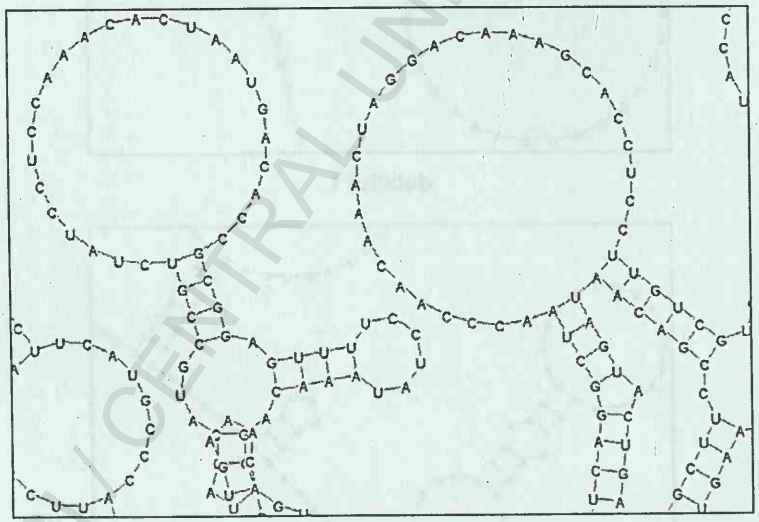


detaliul 2

BCU IAȘI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

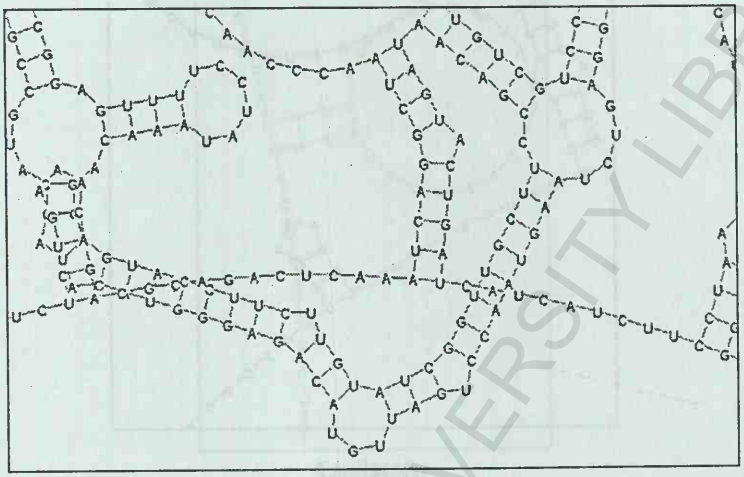


detaliul 3

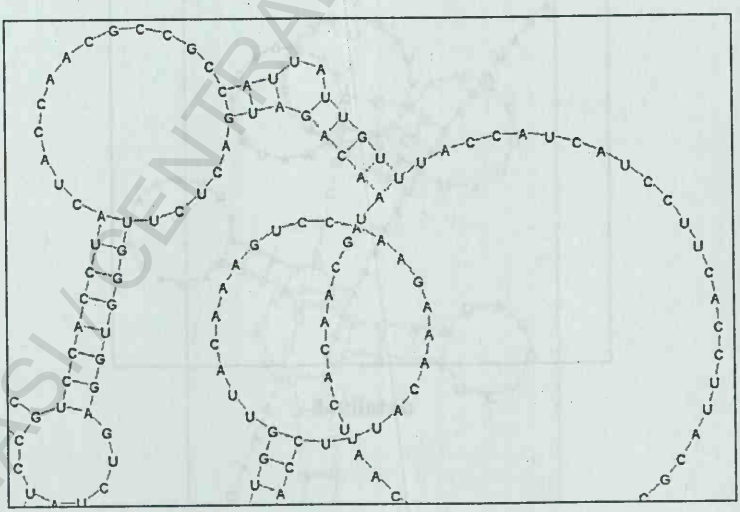


detaliul 4

BCU IAȘI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

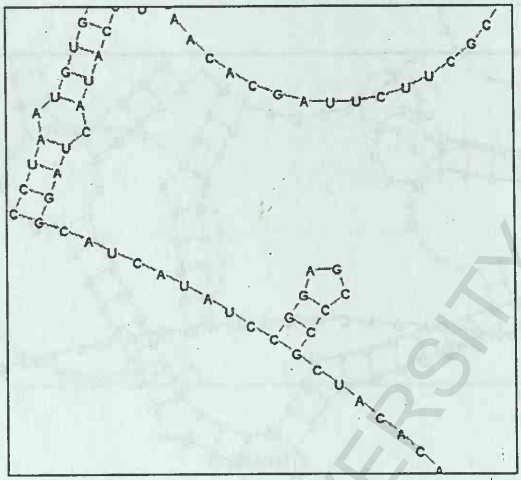


detaliul 5

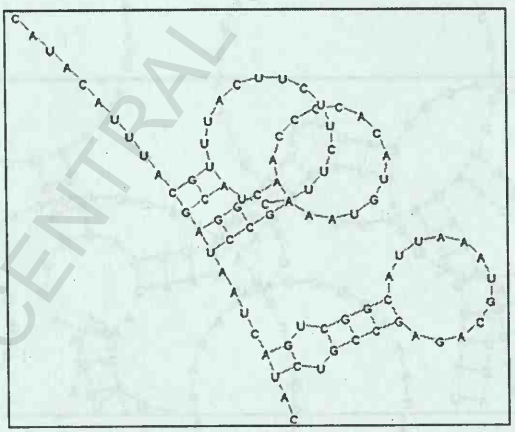


detaliul 6

BCU IAȘI - CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

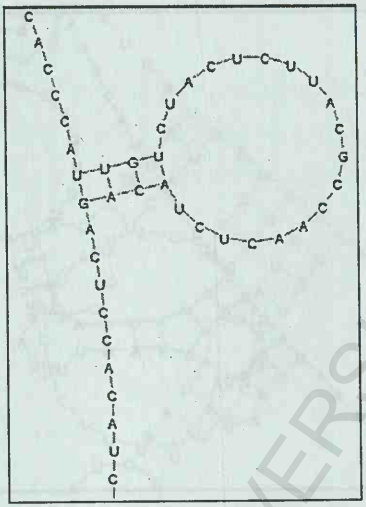


detaliul 7

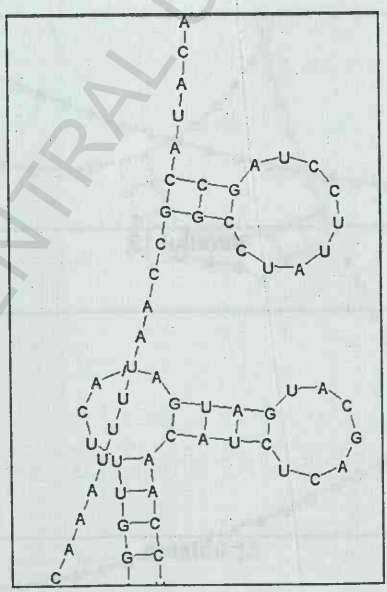


detaliul 8

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

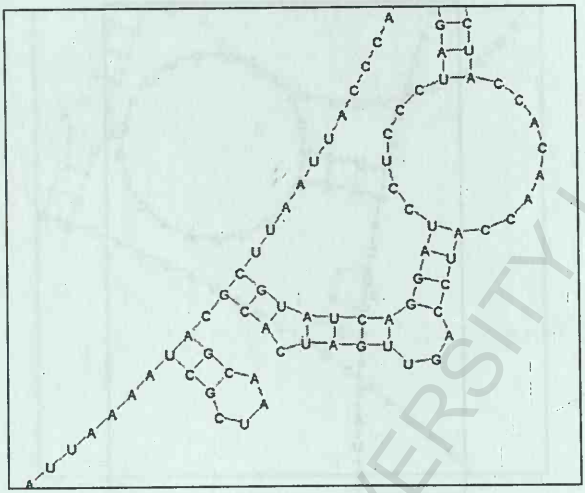


detaliul 9

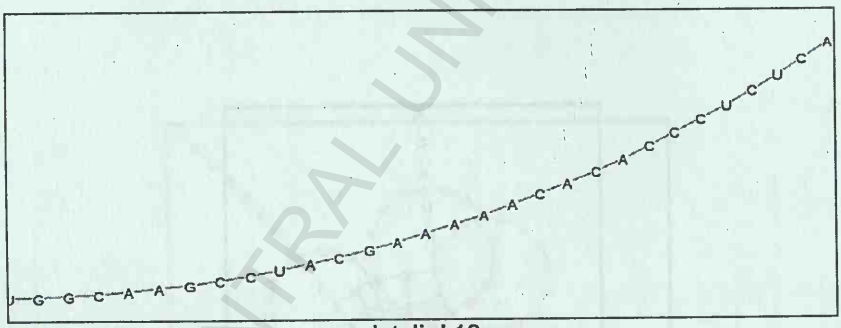


detaliul 10

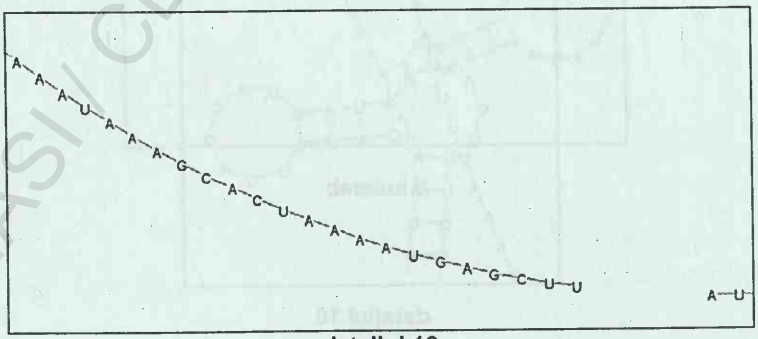
BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY



detaliul 11

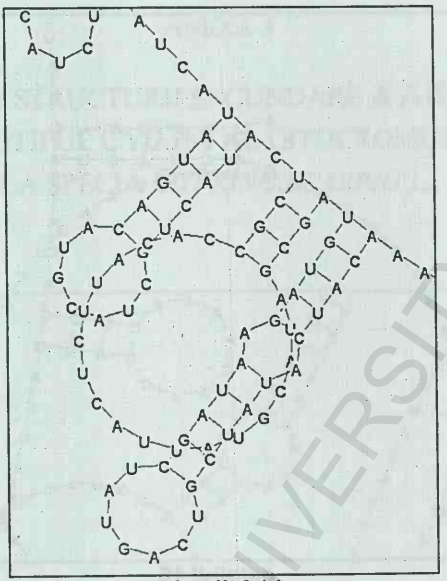


detaliul 12

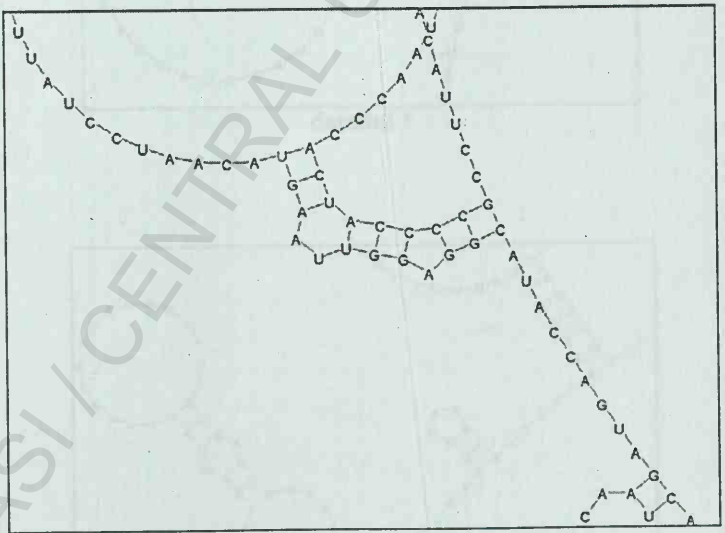


detaliul 13

BCU IAȘI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

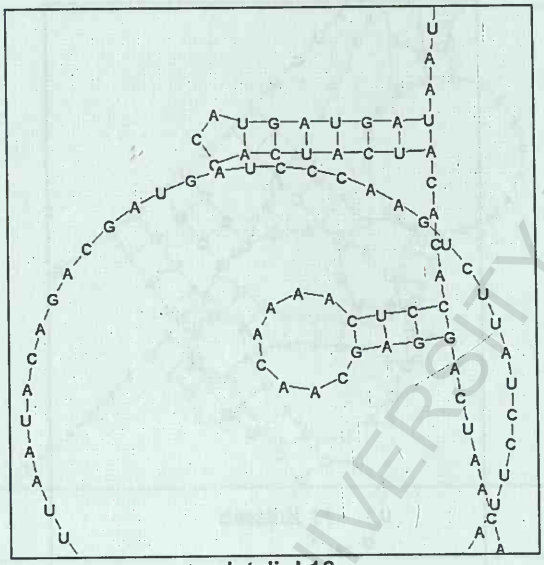


detaliul 14



detaliul 15

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

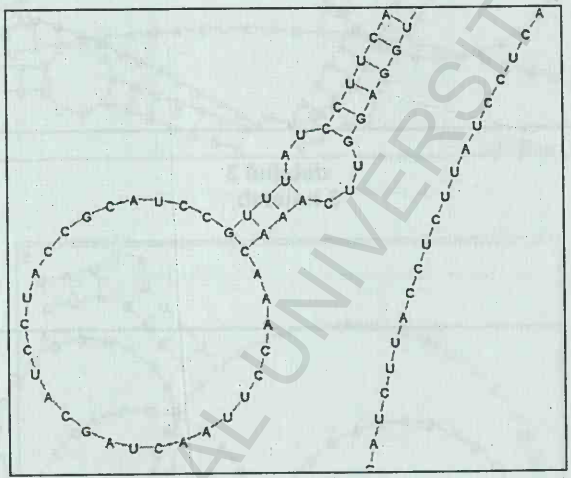


detaliul 16

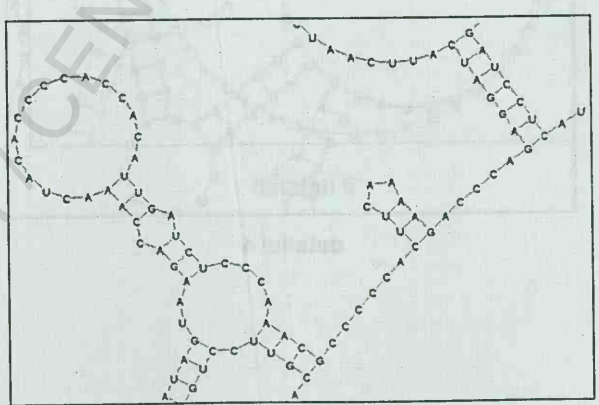
BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

ANEXA 3

MODELAREA STRUCTURII SECUNDARE A ARNM PENTRU HAPLOTIPUL CY03M AL CITOCROMULUI B, LA SPECIA *CYPRINUS CARPIO* L.

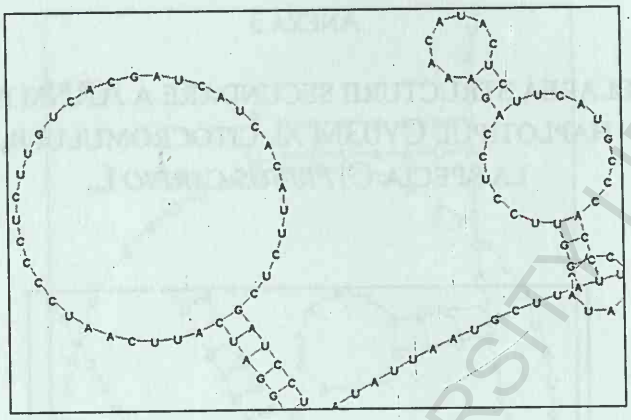


detaliul 1

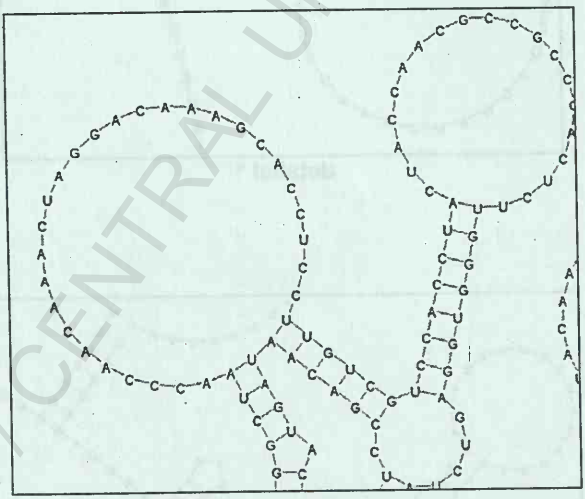


detaliul 2

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

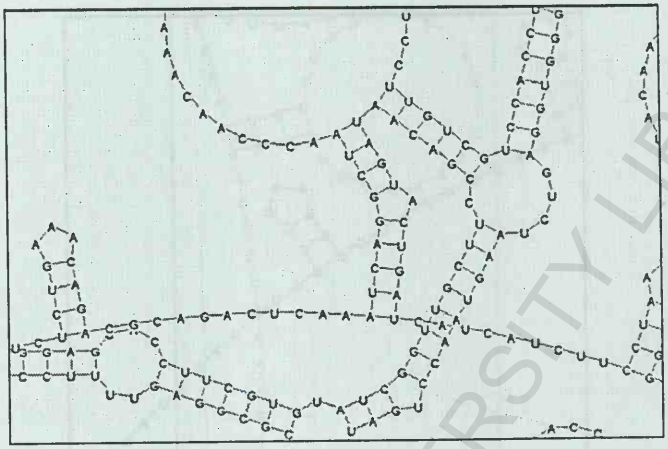


detaliul 3

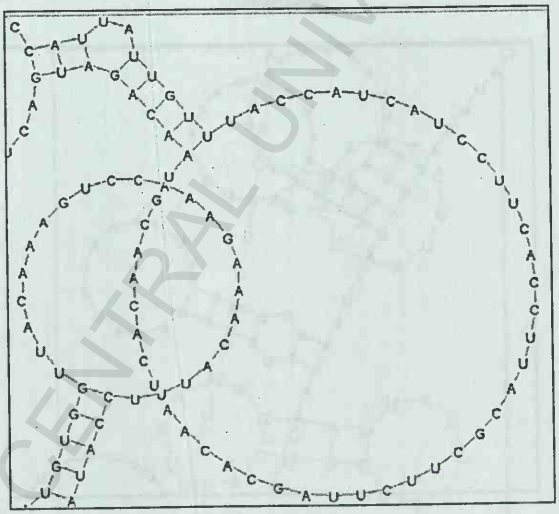


detaliul 4

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

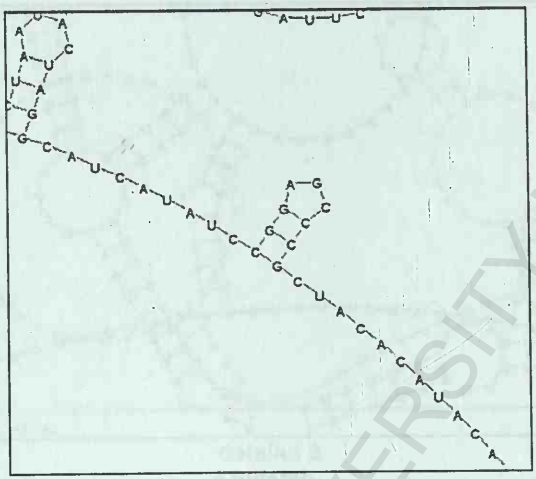


detaliul 5

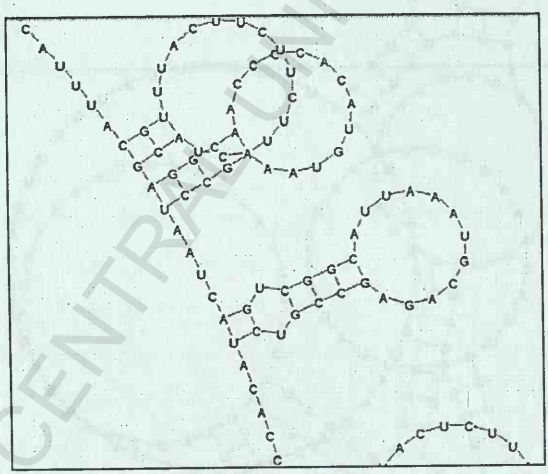


detaliul 6

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

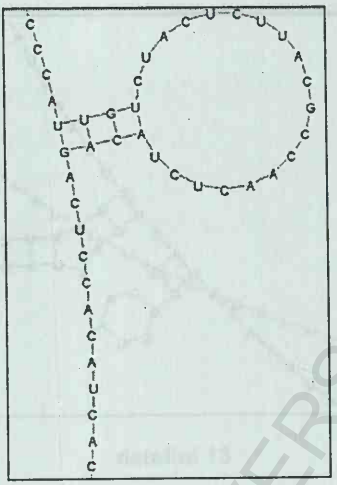


detaliul 7

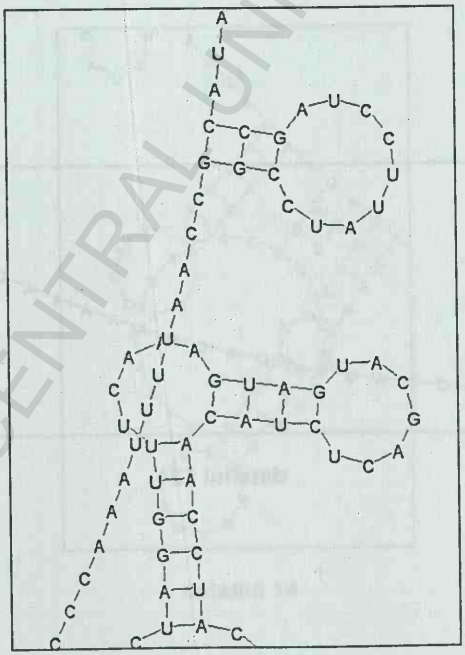


detaliul 8

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

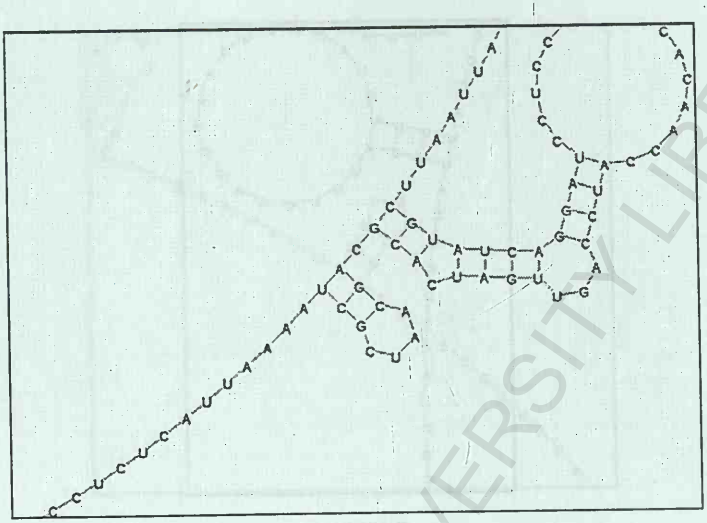


detaliul 9

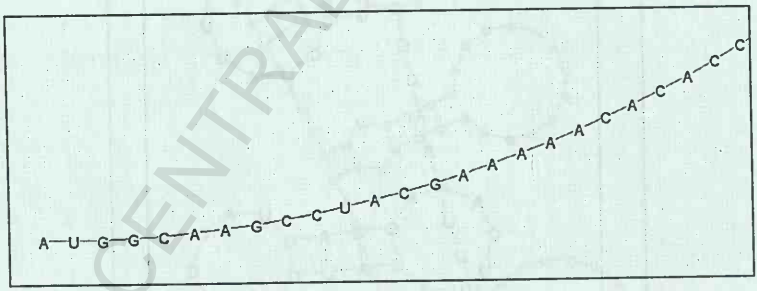


detaliul 10

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

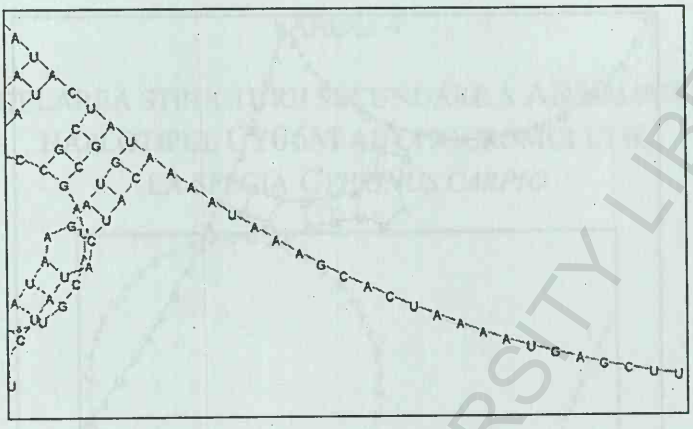


detaliul 11

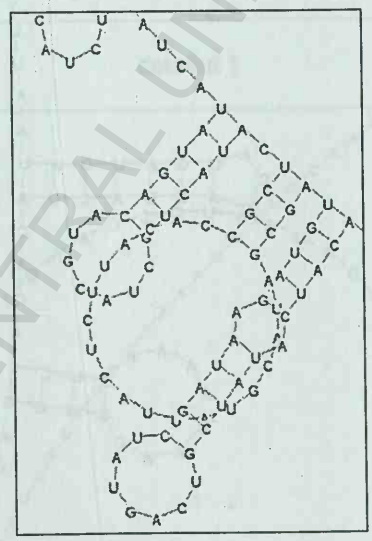


detaliul 12

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY



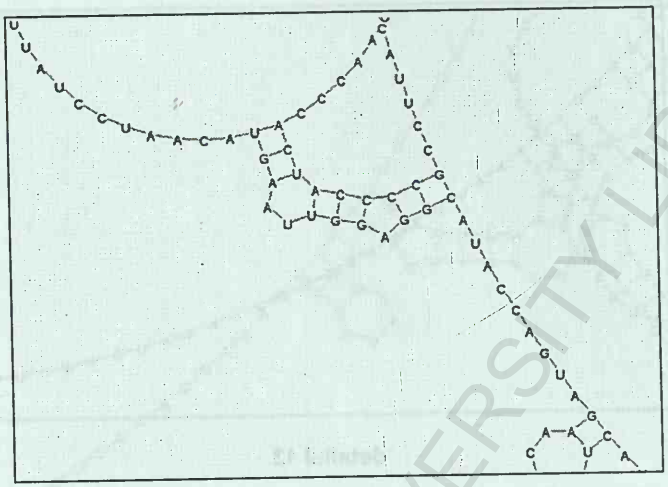
detaliul 13



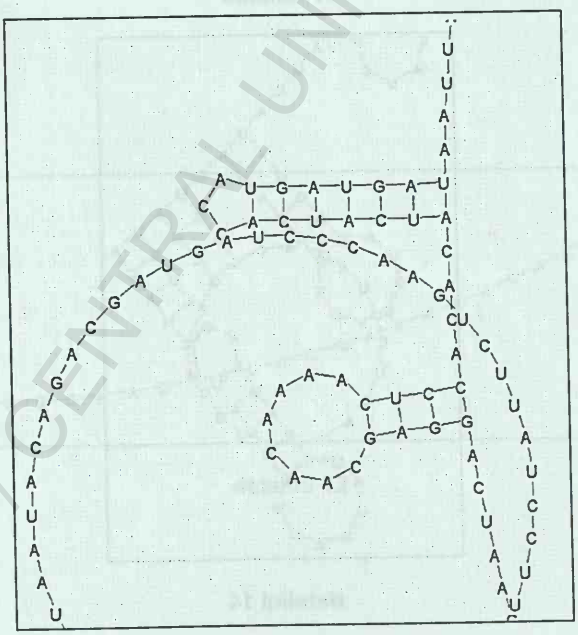
detaliul 14

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

B.C.U. „M. EMINESCU" IAŞI



detaliul 15

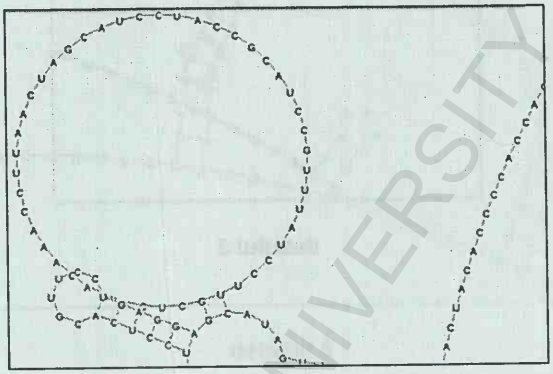


detaliul 16

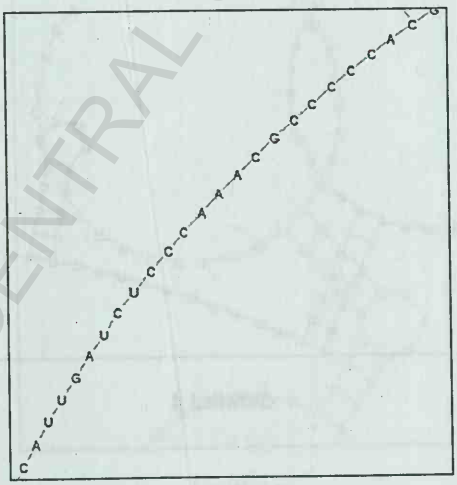
BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

ANEXA 4

MODELAREA STRUCTURII SECUNDARE A ARNM PENTRU HAPLOTIPUL CY06M AL CITOCROMULUI B, LA SPECIA *CYPRINUS CARPIO*

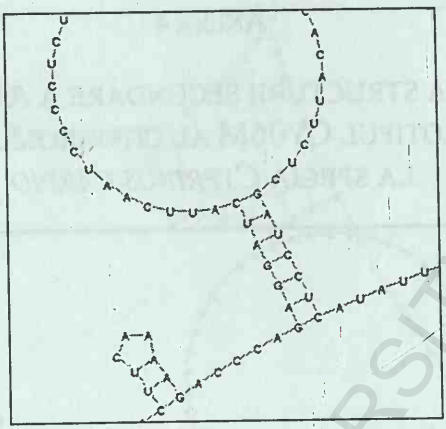


detaliul 1

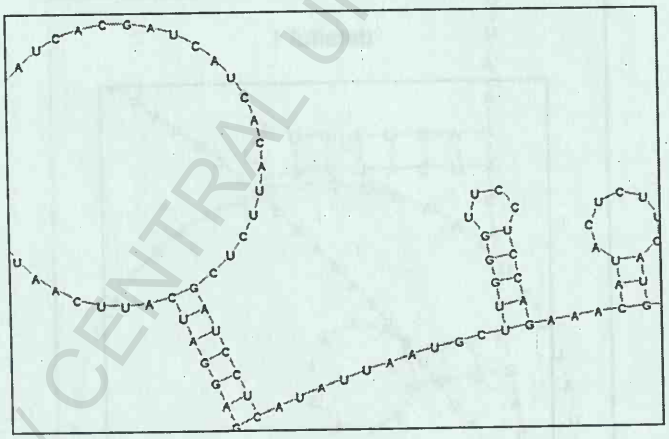


detaliul 2

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

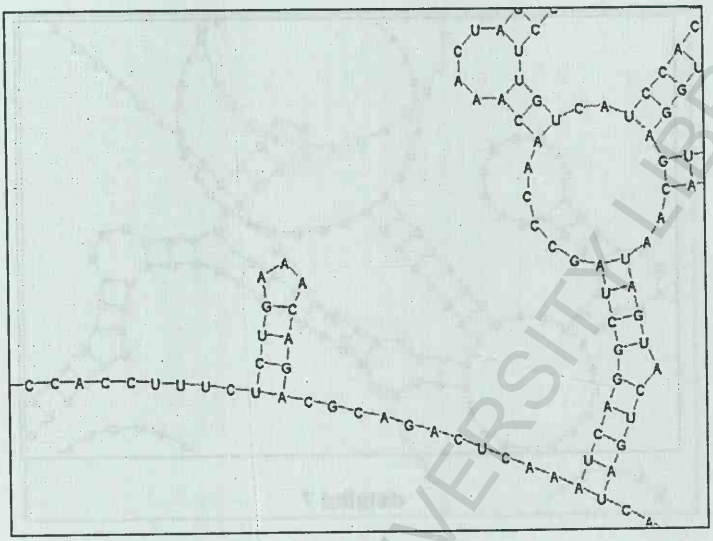


detaliul 3

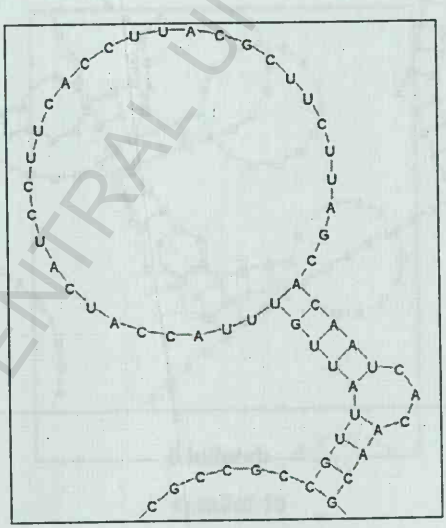


detaliul 4

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

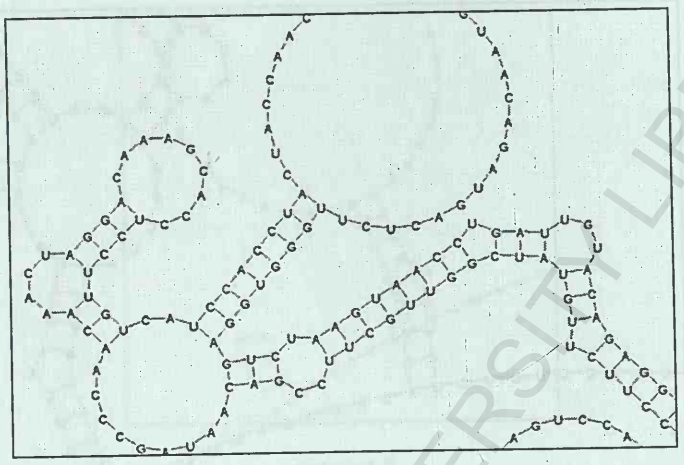


detaliul 5

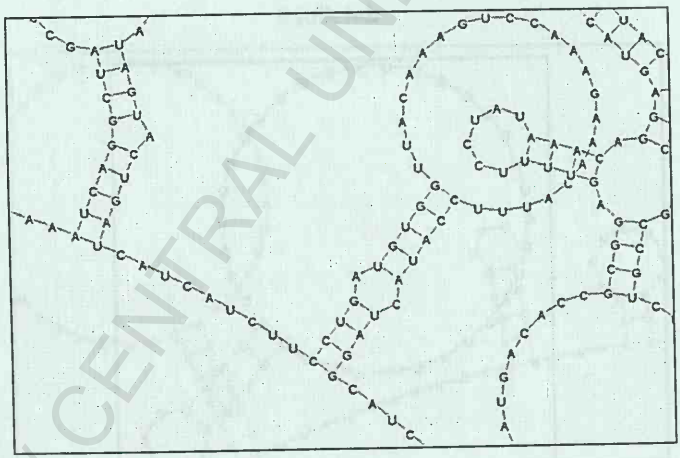


detaliul 6

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

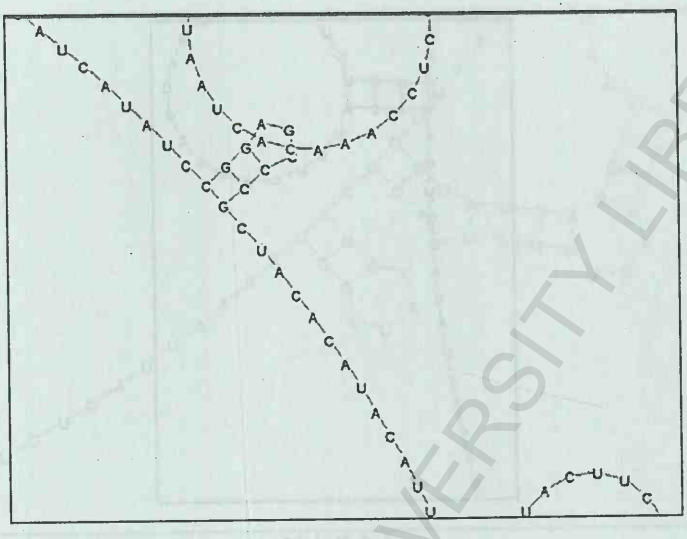


detaliul 7

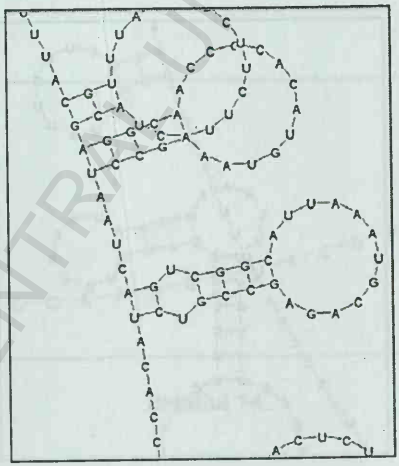


detaliul 8

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

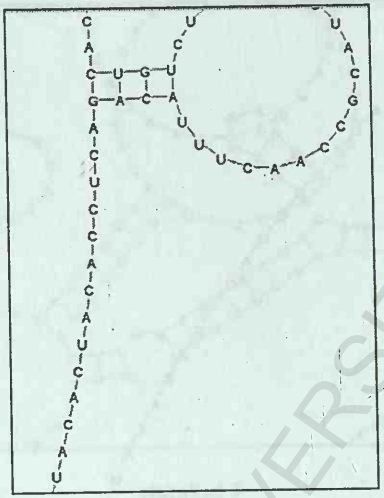


detaliul 9

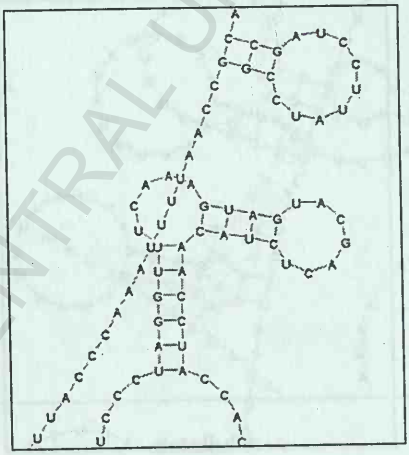


detaliul 10

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

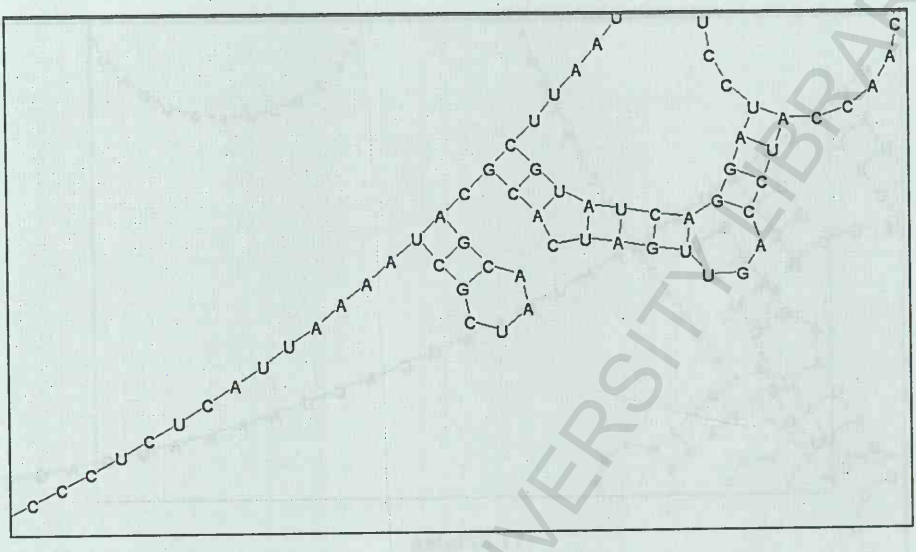


detaliul 11

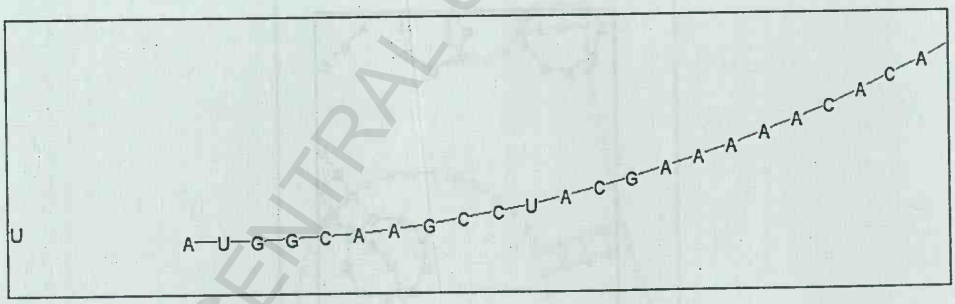


detaliul 12

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

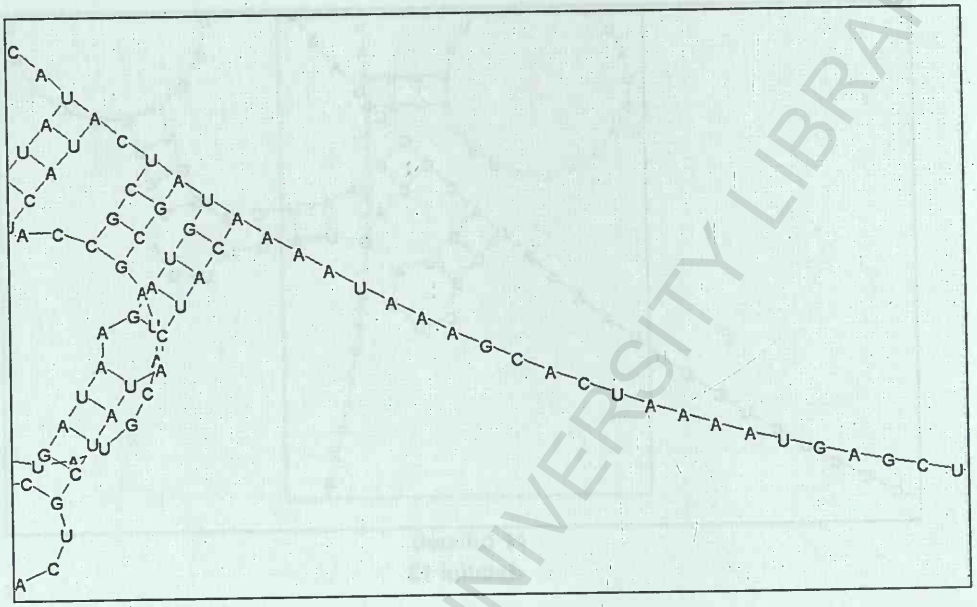


detaliul 13

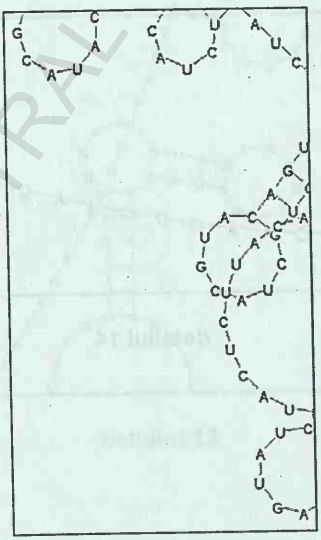


detaliul 14

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

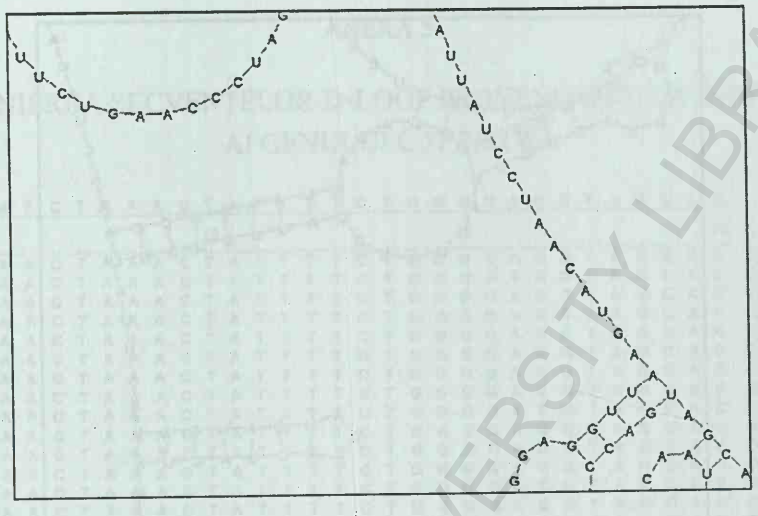


detaliul 15

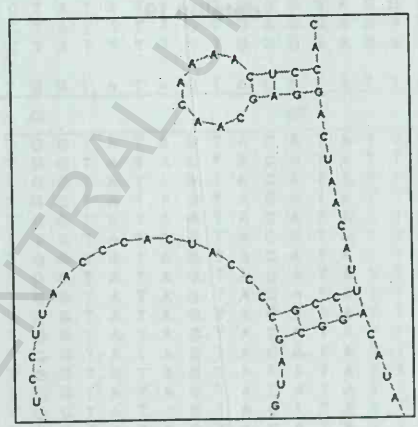


detaliul 16

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

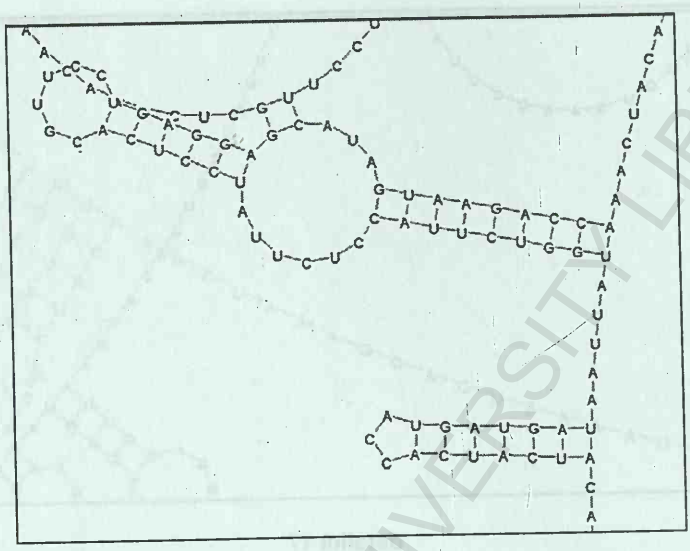


detaliul 17



detaliul 18

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

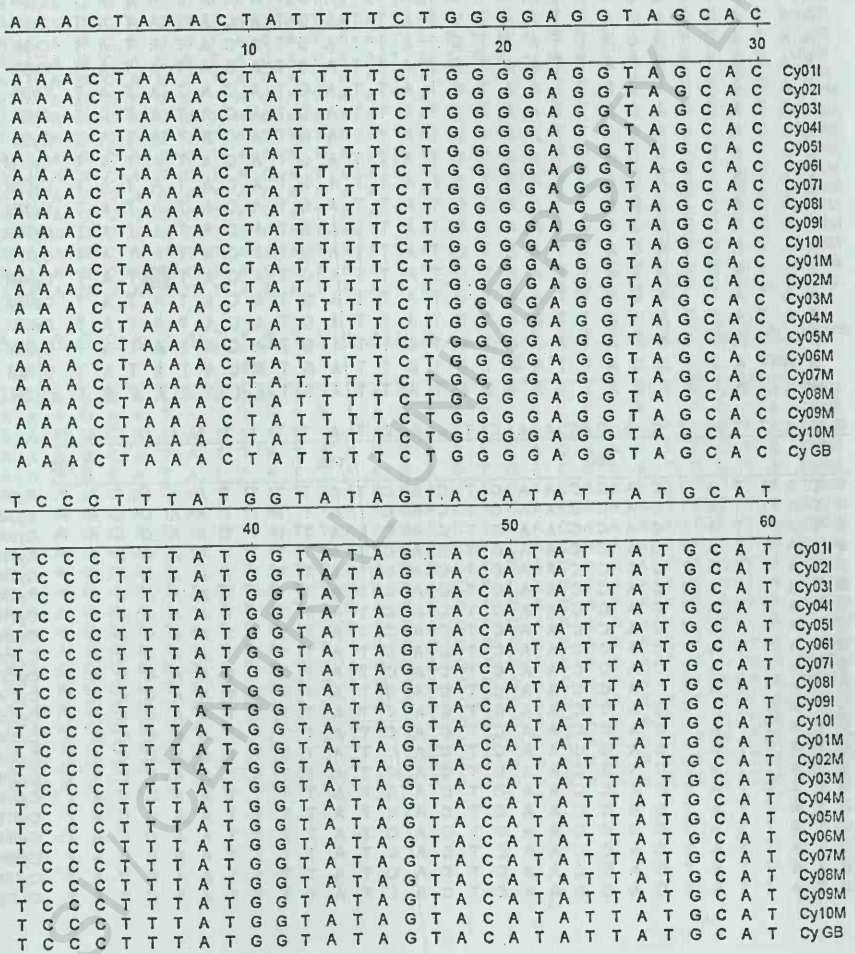


detaliul 19

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

ANEXA 5

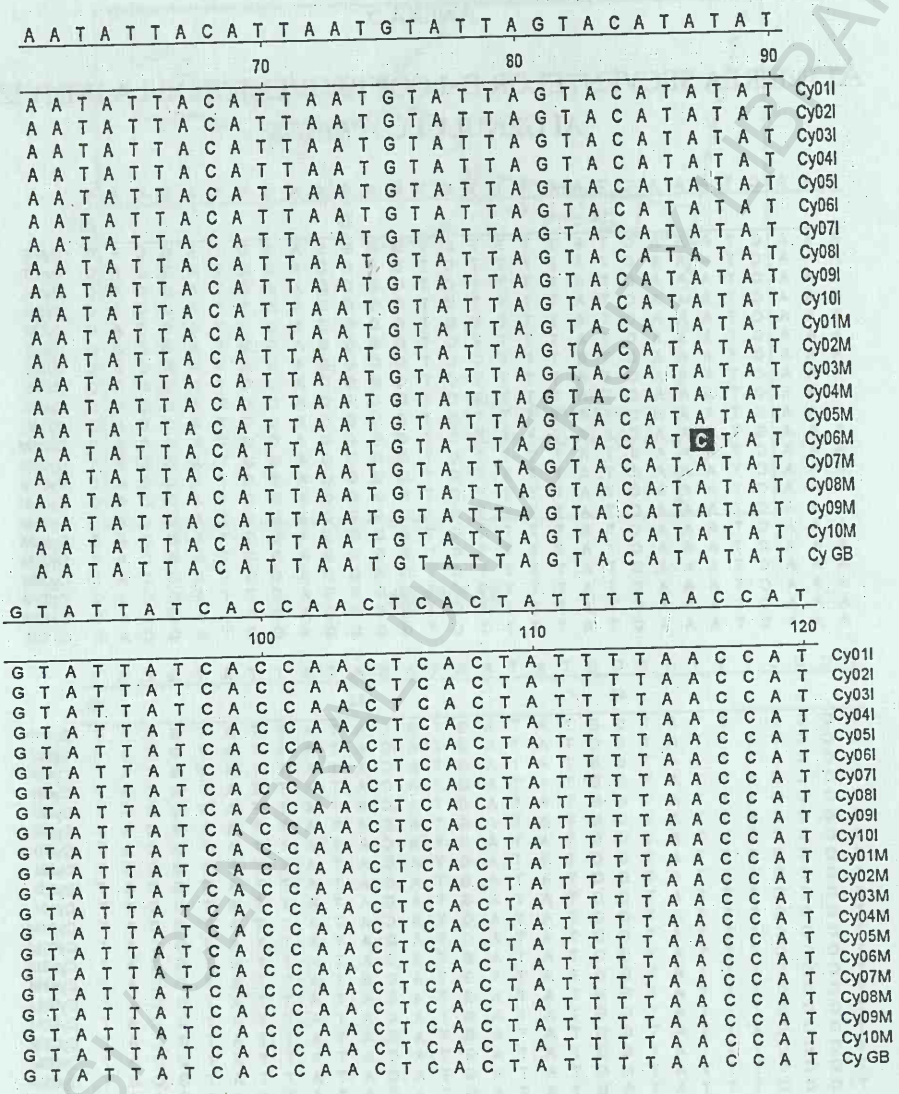
ALINIEREA SECVENȚELOR D-LOOP PROVENITE DE LA INDIVIZI AI GENULUI *CYPRINUS*



A	A	A	C	T	A	A	A	C	T	A	T	T	T	T	C	T	G	G	G	G	A	G	G	T	A	G	C	A	C	
									10										20										30	
A	A	A	C	T	A	A	A	C	T	A	T	T	T	T	C	T	G	G	G	G	A	G	G	T	A	G	C	A	C	Cy01I
A	A	A	C	T	A	A	A	C	T	A	T	T	T	T	C	T	G	G	G	G	A	G	G	T	A	G	C	A	C	Cy02I
A	A	A	C	T	A	A	A	C	T	A	T	T	T	T	C	T	G	G	G	G	A	G	G	T	A	G	C	A	C	Cy03I
A	A	A	C	T	A	A	A	C	T	A	T	T	T	T	C	T	G	G	G	G	A	G	G	T	A	G	C	A	C	Cy04I
A	A	A	C	T	A	A	A	C	T	A	T	T	T	T	C	T	G	G	G	G	A	G	G	T	A	G	C	A	C	Cy05I
A	A	A	C	T	A	A	A	C	T	A	T	T	T	T	C	T	G	G	G	G	A	G	G	T	A	G	C	A	C	Cy06I
A	A	A	C	T	A	A	A	C	T	A	T	T	T	T	C	T	G	G	G	G	A	G	G	T	A	G	C	A	C	Cy07I
A	A	A	C	T	A	A	A	C	T	A	T	T	T	T	C	T	G	G	G	G	A	G	G	T	A	G	C	A	C	Cy08I
A	A	A	C	T	A	A	A	C	T	A	T	T	T	T	C	T	G	G	G	G	A	G	G	T	A	G	C	A	C	Cy09I
A	A	A	C	T	A	A	A	C	T	A	T	T	T	T	C	T	G	G	G	G	A	G	G	T	A	G	C	A	C	Cy10I
A	A	A	C	T	A	A	A	C	T	A	T	T	T	T	C	T	G	G	G	G	A	G	G	T	A	G	C	A	C	Cy01M
A	A	A	C	T	A	A	A	C	T	A	T	T	T	T	C	T	G	G	G	G	A	G	G	T	A	G	C	A	C	Cy02M
A	A	A	C	T	A	A	A	C	T	A	T	T	T	T	C	T	G	G	G	G	A	G	G	T	A	G	C	A	C	Cy03M
A	A	A	C	T	A	A	A	C	T	A	T	T	T	T	C	T	G	G	G	G	A	G	G	T	A	G	C	A	C	Cy04M
A	A	A	C	T	A	A	A	C	T	A	T	T	T	T	C	T	G	G	G	G	A	G	G	T	A	G	C	A	C	Cy05M
A	A	A	C	T	A	A	A	C	T	A	T	T	T	T	C	T	G	G	G	G	A	G	G	T	A	G	C	A	C	Cy06M
A	A	A	C	T	A	A	A	C	T	A	T	T	T	T	C	T	G	G	G	G	A	G	G	T	A	G	C	A	C	Cy07M
A	A	A	C	T	A	A	A	C	T	A	T	T	T	T	C	T	G	G	G	G	A	G	G	T	A	G	C	A	C	Cy08M
A	A	A	C	T	A	A	A	C	T	A	T	T	T	T	C	T	G	G	G	G	A	G	G	T	A	G	C	A	C	Cy09M
A	A	A	C	T	A	A	A	C	T	A	T	T	T	T	C	T	G	G	G	G	A	G	G	T	A	G	C	A	C	Cy10M
A	A	A	C	T	A	A	A	C	T	A	T	T	T	T	C	T	G	G	G	G	A	G	G	T	A	G	C	A	C	Cy GB

T	C	C	C	T	T	T	A	T	G	G	T	A	T	A	G	T	A	C	A	T	A	T	T	A	T	G	C	A	T	
									40										50										60	
T	C	C	C	T	T	T	A	T	G	G	T	A	T	A	G	T	A	C	A	T	A	T	T	A	T	G	C	A	T	Cy01I
T	C	C	C	T	T	T	A	T	G	G	T	A	T	A	G	T	A	C	A	T	A	T	T	A	T	G	C	A	T	Cy02I
T	C	C	C	T	T	T	A	T	G	G	T	A	T	A	G	T	A	C	A	T	A	T	T	A	T	G	C	A	T	Cy03I
T	C	C	C	T	T	T	A	T	G	G	T	A	T	A	G	T	A	C	A	T	A	T	T	A	T	G	C	A	T	Cy04I
T	C	C	C	T	T	T	A	T	G	G	T	A	T	A	G	T	A	C	A	T	A	T	T	A	T	G	C	A	T	Cy05I
T	C	C	C	T	T	T	A	T	G	G	T	A	T	A	G	T	A	C	A	T	A	T	T	A	T	G	C	A	T	Cy06I
T	C	C	C	T	T	T	A	T	G	G	T	A	T	A	G	T	A	C	A	T	A	T	T	A	T	G	C	A	T	Cy07I
T	C	C	C	T	T	T	A	T	G	G	T	A	T	A	G	T	A	C	A	T	A	T	T	A	T	G	C	A	T	Cy08I
T	C	C	C	T	T	T	A	T	G	G	T	A	T	A	G	T	A	C	A	T	A	T	T	A	T	G	C	A	T	Cy09I
T	C	C	C	T	T	T	A	T	G	G	T	A	T	A	G	T	A	C	A	T	A	T	T	A	T	G	C	A	T	Cy10I
T	C	C	C	T	T	T	A	T	G	G	T	A	T	A	G	T	A	C	A	T	A	T	T	A	T	G	C	A	T	Cy01M
T	C	C	C	T	T	T	A	T	G	G	T	A	T	A	G	T	A	C	A	T	A	T	T	A	T	G	C	A	T	Cy02M
T	C	C	C	T	T	T	A	T	G	G	T	A	T	A	G	T	A	C	A	T	A	T	T	A	T	G	C	A	T	Cy03M
T	C	C	C	T	T	T	A	T	G	G	T	A	T	A	G	T	A	C	A	T	A	T	T	A	T	G	C	A	T	Cy04M
T	C	C	C	T	T	T	A	T	G	G	T	A	T	A	G	T	A	C	A	T	A	T	T	A	T	G	C	A	T	Cy05M
T	C	C	C	T	T	T	A	T	G	G	T	A	T	A	G	T	A	C	A	T	A	T	T	A	T	G	C	A	T	Cy06M
T	C	C	C	T	T	T	A	T	G	G	T	A	T	A	G	T	A	C	A	T	A	T	T	A	T	G	C	A	T	Cy07M
T	C	C	C	T	T	T	A	T	G	G	T	A	T	A	G	T	A	C	A	T	A	T	T	A	T	G	C	A	T	Cy08M
T	C	C	C	T	T	T	A	T	G	G	T	A	T	A	G	T	A	C	A	T	A	T	T	A	T	G	C	A	T	Cy09M
T	C	C	C	T	T	T	A	T	G	G	T	A	T	A	G	T	A	C	A	T	A	T	T	A	T	G	C	A	T	Cy10M
T	C	C	C	T	T	T	A	T	G	G	T	A	T	A	G	T	A	C	A	T	A	T	T	A	T	G	C	A	T	Cy GB

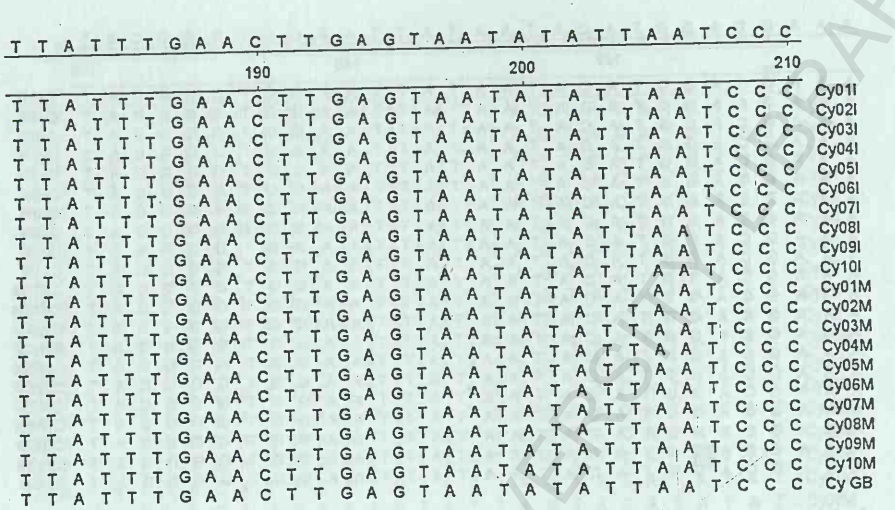
BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY


A A T A T T A C A T T A A T G T A T T A G T A C A T A T A T
70
80
90
A A T A T T A C A T T A A T G T A T T A G T A C A T A T A T Cy01I
A A T A T T A C A T T A A T G T A T T A G T A C A T A T A T Cy02I
A A T A T T A C A T T A A T G T A T T A G T A C A T A T A T Cy03I
A A T A T T A C A T T A A T G T A T T A G T A C A T A T A T Cy04I
A A T A T T A C A T T A A T G T A T T A G T A C A T A T A T Cy05I
A A T A T T A C A T T A A T G T A T T A G T A C A T A T A T Cy06I
A A T A T T A C A T T A A T G T A T T A G T A C A T A T A T Cy07I
A A T A T T A C A T T A A T G T A T T A G T A C A T A T A T Cy08I
A A T A T T A C A T T A A T G T A T T A G T A C A T A T A T Cy09I
A A T A T T A C A T T A A T G T A T T A G T A C A T A T A T Cy10I
A A T A T T A C A T T A A T G T A T T A G T A C A T A T A T Cy01M
A A T A T T A C A T T A A T G T A T T A G T A C A T A T A T Cy02M
A A T A T T A C A T T A A T G T A T T A G T A C A T A T A T Cy03M
A A T A T T A C A T T A A T G T A T T A G T A C A T A T A T Cy04M
A A T A T T A C A T T A A T G T A T T A G T A C A T A T A T Cy05M
A A T A T T A C A T T A A T G T A T T A G T A C A T C T A T Cy06M
A A T A T T A C A T T A A T G T A T T A G T A C A T A T A T Cy07M
A A T A T T A C A T T A A T G T A T T A G T A C A T A T A T Cy08M
A A T A T T A C A T T A A T G T A T T A G T A C A T A T A T Cy09M
A A T A T T A C A T T A A T G T A T T A G T A C A T A T A T Cy10M
A A T A T T A C A T T A A T G T A T T A G T A C A T A T A T Cy GB
G T A T T A T C A C C A A C T C A C T A T T T T A A C C A T
100
110
120
G T A T T A T C A C C A A C T C A C T A T T T T A A C C A T Cy01I
G T A T T A T C A C C A A C T C A C T A T T T T A A C C A T Cy02I
G T A T T A T C A C C A A C T C A C T A T T T T A A C C A T Cy03I
G T A T T A T C A C C A A C T C A C T A T T T T A A C C A T Cy04I
G T A T T A T C A C C A A C T C A C T A T T T T A A C C A T Cy05I
G T A T T A T C A C C A A C T C A C T A T T T T A A C C A T Cy06I
G T A T T A T C A C C A A C T C A C T A T T T T A A C C A T Cy07I
G T A T T A T C A C C A A C T C A C T A T T T T A A C C A T Cy08I
G T A T T A T C A C C A A C T C A C T A T T T T A A C C A T Cy09I
G T A T T A T C A C C A A C T C A C T A T T T T A A C C A T Cy10I
G T A T T A T C A C C A A C T C A C T A T T T T A A C C A T Cy01M
G T A T T A T C A C C A A C T C A C T A T T T T A A C C A T Cy02M
G T A T T A T C A C C A A C T C A C T A T T T T A A C C A T Cy03M
G T A T T A T C A C C A A C T C A C T A T T T T A A C C A T Cy04M
G T A T T A T C A C C A A C T C A C T A T T T T A A C C A T Cy05M
G T A T T A T C A C C A A C T C A C T A T T T T A A C C A T Cy06M
G T A T T A T C A C C A A C T C A C T A T T T T A A C C A T Cy07M
G T A T T A T C A C C A A C T C A C T A T T T T A A C C A T Cy08M
G T A T T A T C A C C A A C T C A C T A T T T T A A C C A T Cy09M
G T A T T A T C A C C A A C T C A C T A T T T T A A C C A T Cy10M
G T A T T A T C A C C A A C T C A C T A T T T T A A C C A T Cy GB

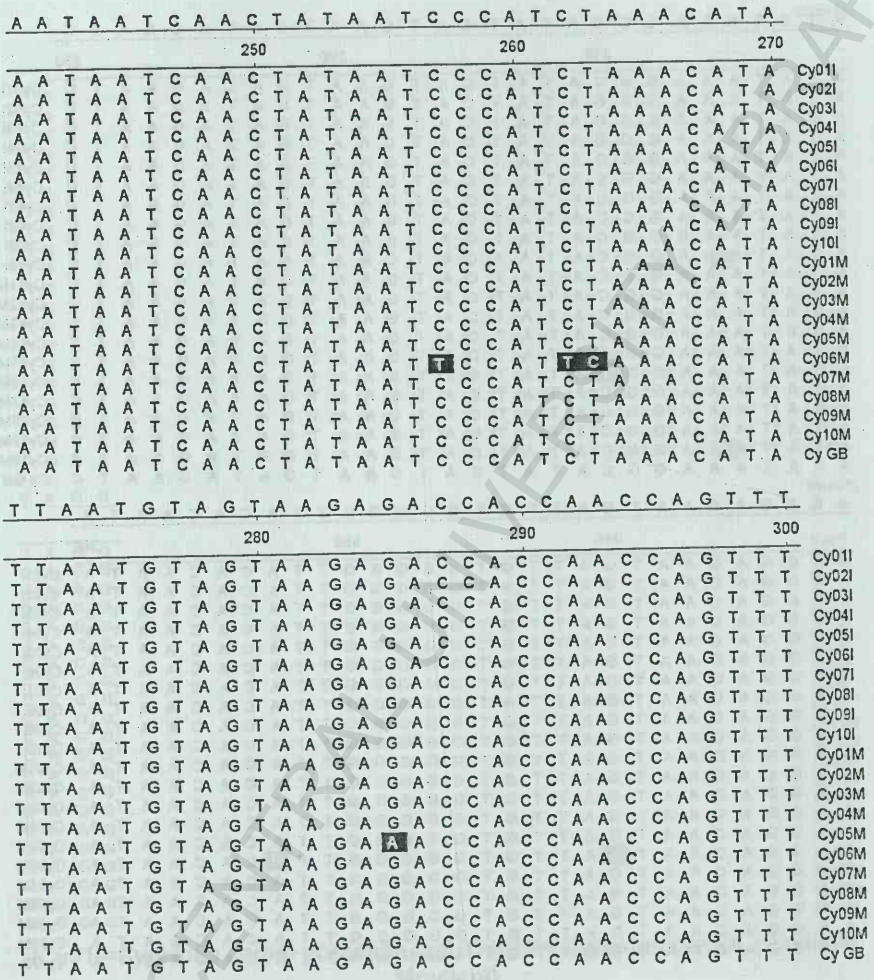
BCU IAȘI

```
A A A G C A G G T A C A T A A T A T T A A G G T G G G C A T
                  130                 140                 150
A A A G C A G G T A C A T A A T A T T A A G G T G G G C A T  Cy01I
A A A G C A G G T A C A T A A T A T T A A G G T G G G C A T  Cy02I
A A A G C A G G T A C A T A A T A T T A A G G T G G G C A T  Cy03I
A A A G C A G G T A C A T A A T A T T A A G G T G G G C A T  Cy04I
A A A G C A G G T A C A T A A T A T T A A G G T G G G C A T  Cy05I
A A A G C A G G T A C A T A A T A T T A A G G T G G G C A T  Cy06I
A A A G C A G G T A C A T A A T A T T A A G G T G G G C A T  Cy07I
A A A G C A G G T A C A T A A T A T T A A G G T G G G C A T  Cy08I
A A A G C A G G T A C A T A A T A T T A A G G T G G G C A T  Cy09I
A A A G C A G G T A C A T A A T A T T A A G G T G G G C A T  Cy10I
A A A G C A G G T A C A T A A T A T T A A G G T G G G C A T  Cy01M
A A A G C A G G T A C A T A A T A T T A A G G T G G G C A T  Cy02M
A A A G C A G G T A C A T A A T A T T A A G G T G G G C A T  Cy03M
A A A G C A G G T A C A T A A T A T T A A G G T G G G C A T  Cy04M
A A A G C A G G T A C A T A A T A T T A A G G T G G G C A T  Cy05M
A A A G C A G G T A C A T A A T A T T A A G G T G G G C A T  Cy06M
A A A G C A G G T A C A T A A T A T T A A G G T G G G C A T  Cy07M
A A A G C A G G T A C A T A A T A T T A A G G T G G G C A T  Cy08M
A A A G C A G G T A C A T A A T A T T A A G G T G G G C A T  Cy09M
A A A G C A G G T A C A T A A T A T T A A G G T G G G C A T  Cy10M
A A A G C A G G T A C A T A A T A T T A A G G T G G G C A T  Cy GB

A A A G C A T A T T A T T A A G A C T C A C A A A T T C T A  Majority
                  160                 170                 180
A A A G C A T A T T A T T A A G A C T C A C A A A T T C T A  Cy01I
A A A G C A T A T T A T T A A G A C T C A C A A A T T C T A  Cy02I
A A A G C A T A T T A T T A A G A C T C A C A A A T T C T A  Cy03I
A A A G C A T A T T A T T A A G A C T C A C A A A T T C T A  Cy04I
A A A G C A T A T T A T T A A G A C T C A C A A A T T C T A  Cy05I
A A A G C A T A T T A T T A A G A C T C A C A A A T T C T A  Cy06I
A A A G C A T A T T A T T A A G A C T C A C A A A T T C T A  Cy07I
A A A G C A T A T T A T T A A G A C T C A C A A A T T C T A  Cy08I
A A A G C A T A T T A T T A A G A C T C A C A A A T T C T A  Cy09I
A A A G C A T A T T A T T A A G A C T C A C A A A T T C T A  Cy10I
A A A G C A T A T T A T T A A G A C T C A C A A A T T C T A  Cy01M
A A A G C A T A T T A T T A A G A C T C A C A A A T T C T A  Cy02M
A A A G C A T A T T A T T A A G A C T C A C A A A T T C T A  Cy03M
A A A G C A T A T T A T T A A G A C T C A C A A A T T C T A  Cy04M
A A A G C A T A T T A T T A A G A C T C A C A A A T T C T A  Cy05M
A A A G C A T A T T A T T A A G A C T C A C A A A T T C T A  Cy06M
A A A G C A T A T T A T T A A G A C T C A C A A A T T C T A  Cy07M
A A A G C A T A T T A T T A A G A C T C A C A A A T T C T A  Cy08M
A A A G C A T A T T A T T A A G A C T C A C A A A T T C T A  Cy09M
A A A G C A T A T T A T T A A G A C T C A C A A A T T C T A  Cy10M
A A A G C A T A T T A T T A A G A C T C A C A A A T T C T A  Cy GB
```

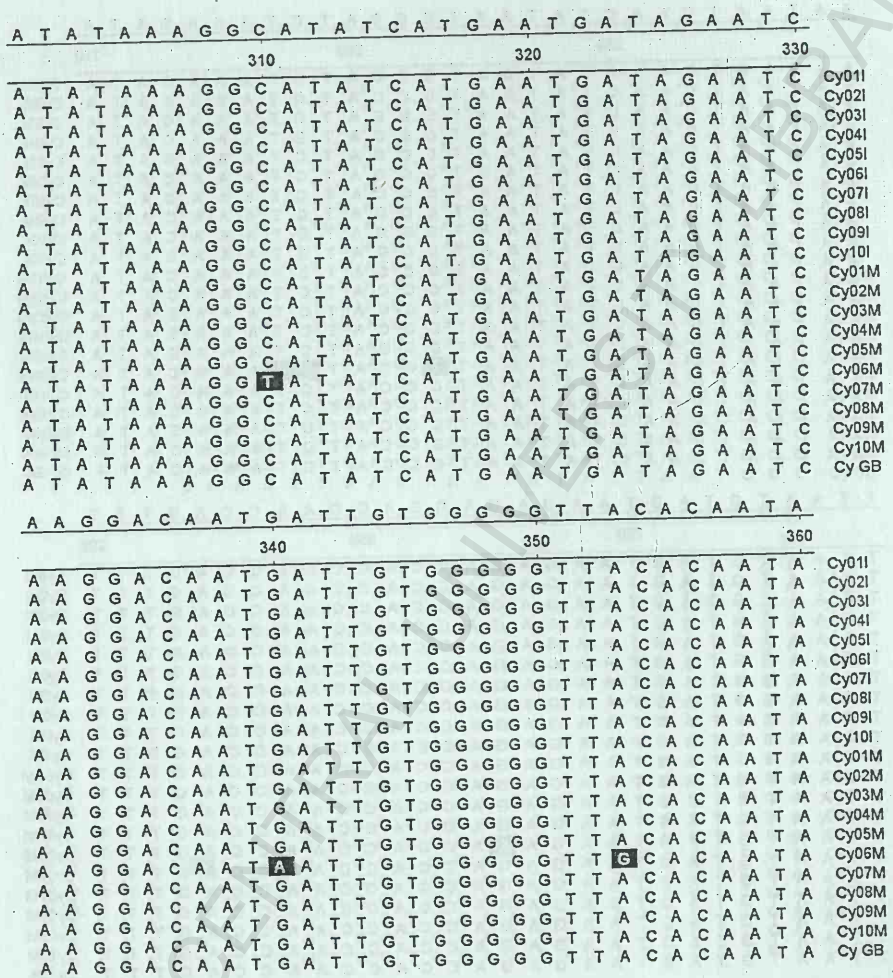
BCU IASI / CENTRUL DE RESURSE PENTRU BIBLIOTECARI



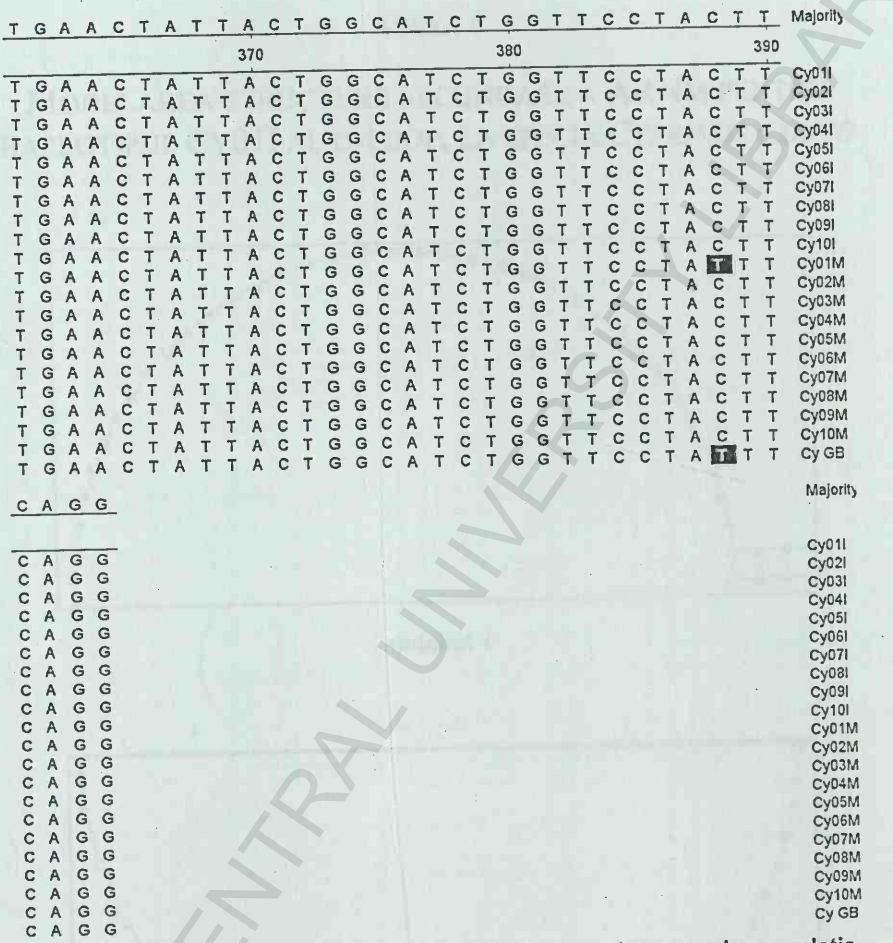
BCU IASI / CENTRUL UNIVERSITAR LIBRARY



BCU IASI / COLECȚIA DIGITALĂ



BCU IASI / CENTRUL DE RESURSE PENTRU BIBLIOTECARI

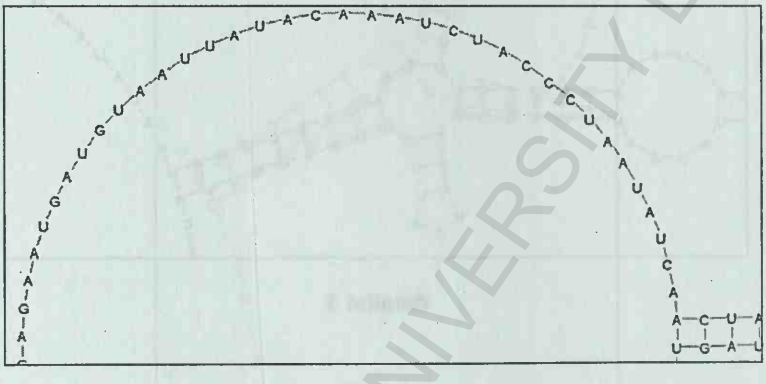


(Cy01I=*Cyprinus carpio* populația Iași, Cy01M= *Cyprinus carpio*, populația Movileni)

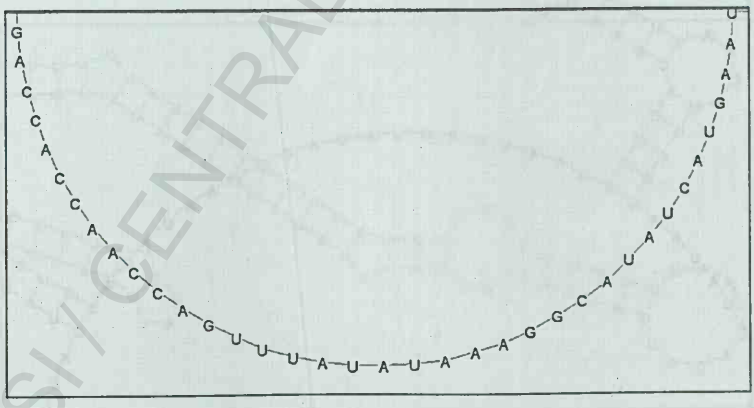
BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

ANEXA 6

MODELAREA STRUCTURII SECUNDARE A ARNM PENTRU HAPLOTIPUL CY01I AL D-LOOP, LA SPECIA *CYPRINUS CARPIO*

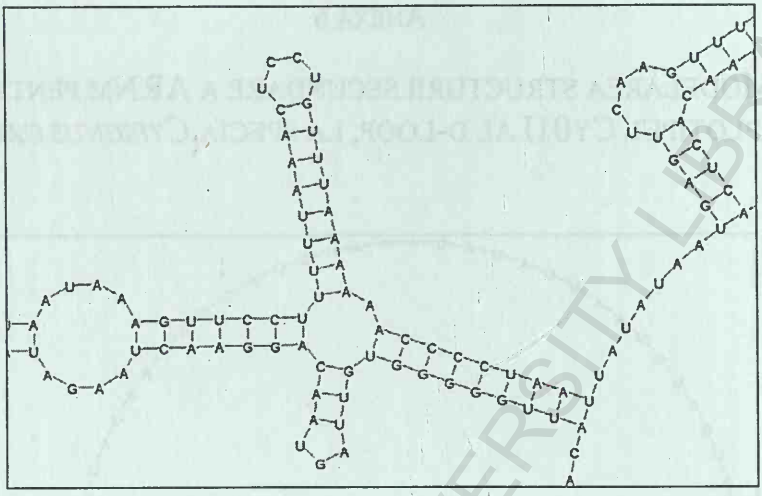


detaliul 1

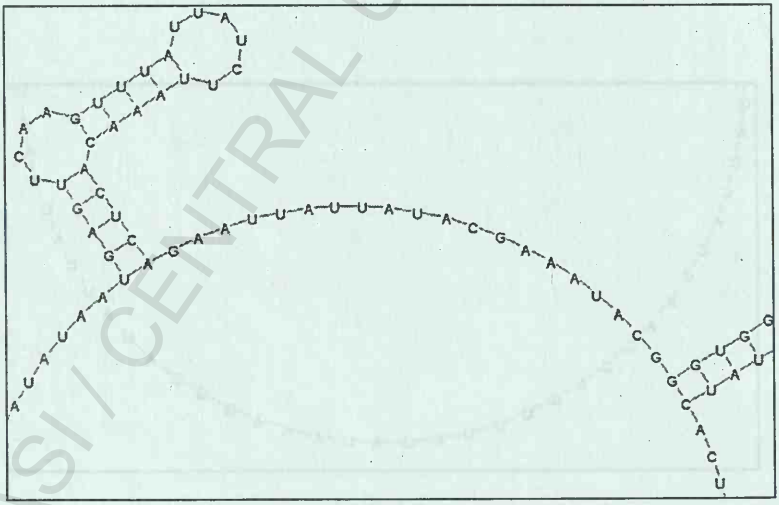


detaliul 2

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

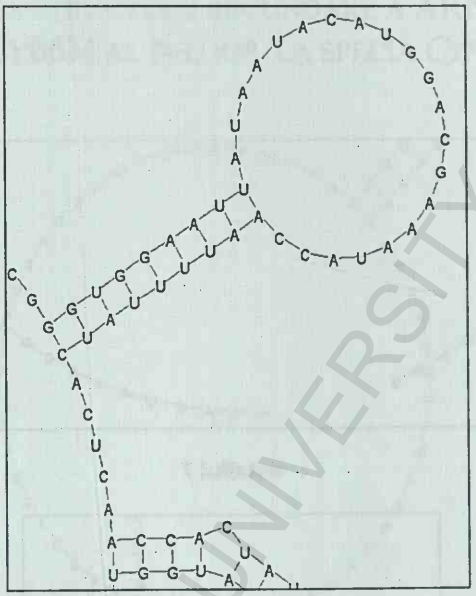


detaliul 3

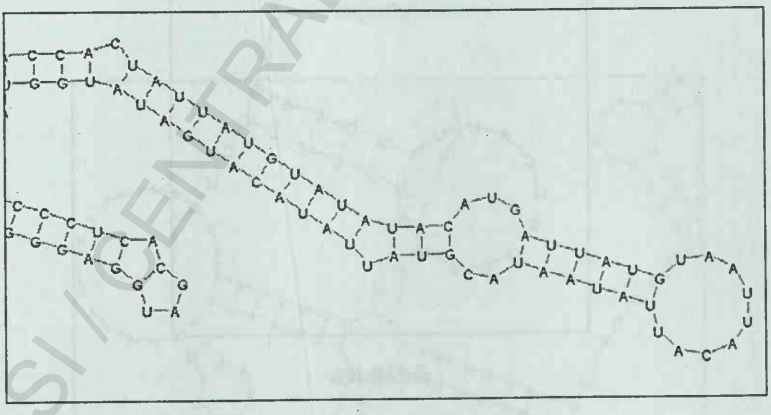


detaliul 4

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

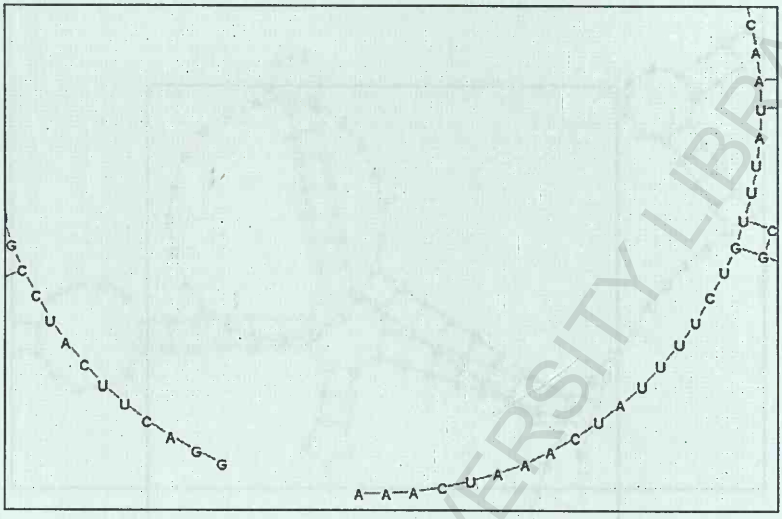


detaliul 5

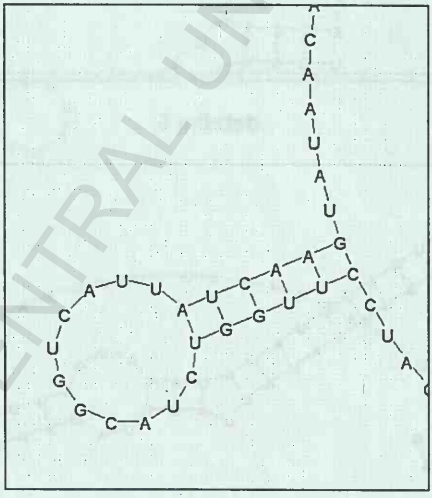


detaliul 6

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY



detaliul 7

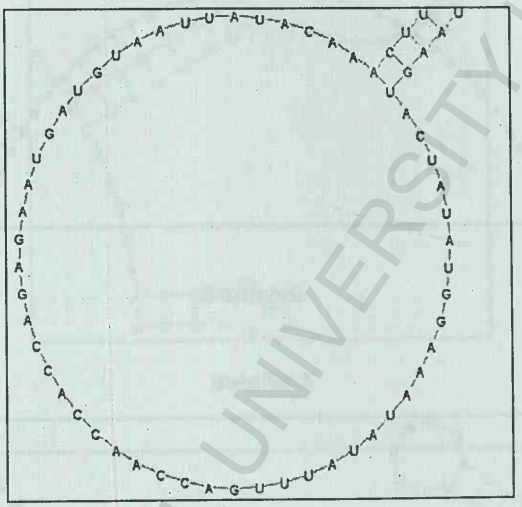


detaliul 8

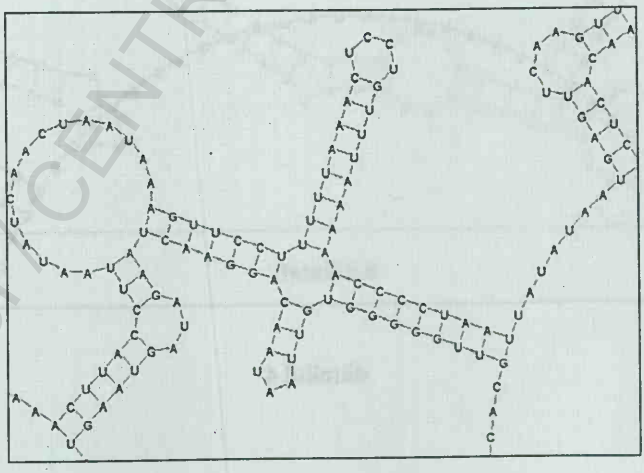
BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

ANEXA 7

MODELAREA STRUCTURII SECUNDARE A ARNM PENTRU HAPLOTIPUL CY06M AL D-LOOP, LA SPECIA *CYPRINUS CARPIO*

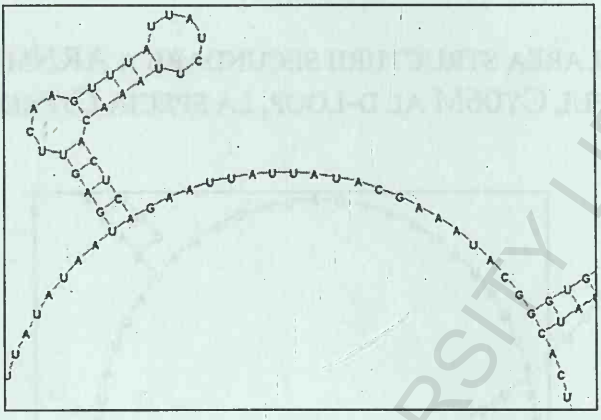


detaliul 1

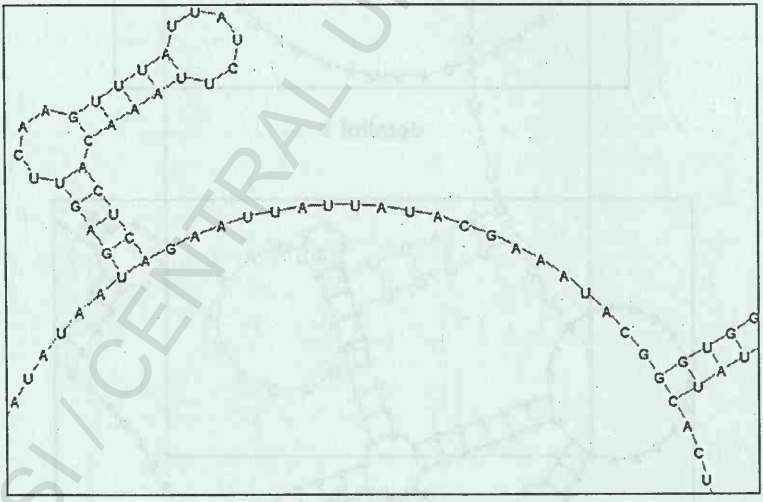


detaliul 2

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

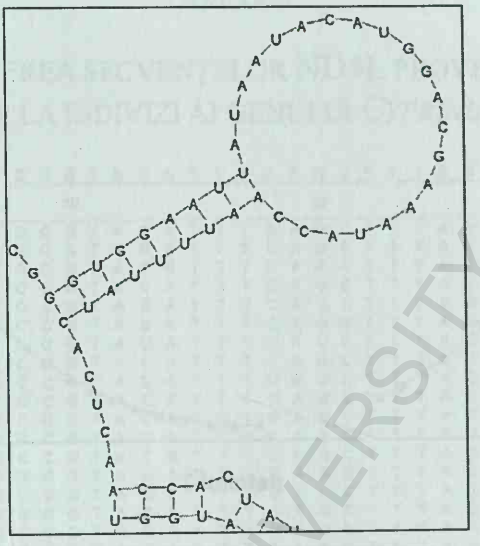


detaliul 3

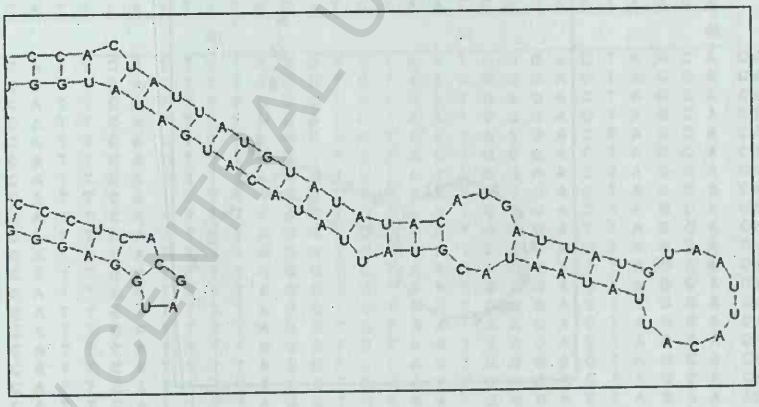


detaliul 4

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

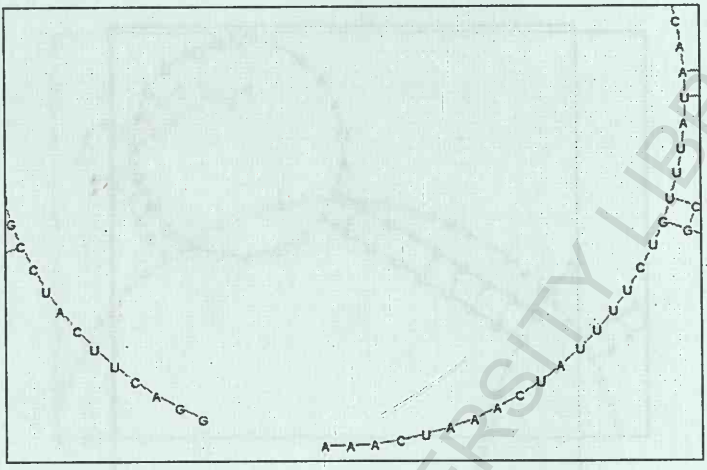


detaliul 5

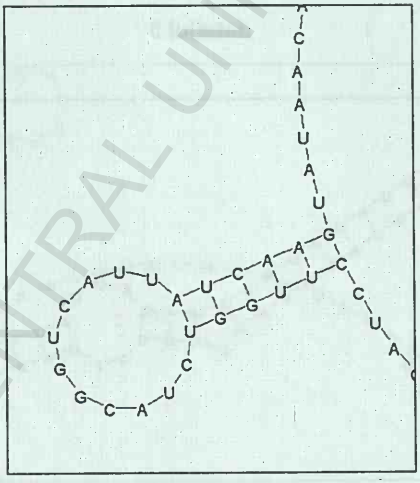


detaliul 6

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY



detaliul 7



detaliul 8

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

ANEXA 8

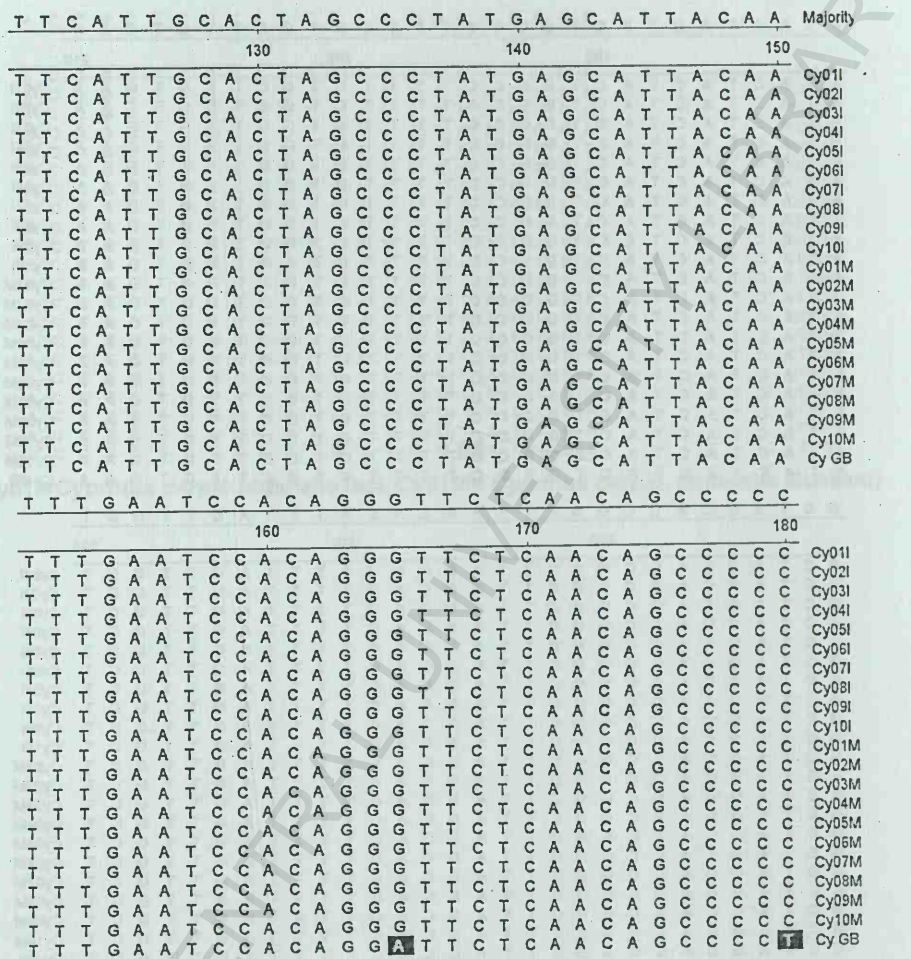
ALINIEREA SECVENȚELOR ND4L PROVENITE DE LA INDIVIZI AI GENULUI *CYPRINUS*

```
A T G A C A C C C G T A C A T T T C A G C T T T A G C T C A
                  10                  20                  30
A T G A C A C C C G T A C A T T T C A G C T T T A G C T C A Cy01I
A T G A C A C C C G T A C A T T T C A G C T T T A G C T C A Cy02I
A T G A C A C C C G T A C A T T T C A G C T T T A G C T C A Cy03I
A T G A C A C C C G T A C A T T T C A G C T T T A G C T C A Cy04I
A T G A C A C C C G T A C A T T T C A G C T T T A G C T C A Cy05I
A T G A C A C C C G T A C A T T T C A G C T T T A G C T C A Cy06I
A T G A C A C C C G T A C A T T T C A G C T T T A G C T C A Cy07I
A T G A C A C C C G T A C A T T T C A G C T T T A G C T C A Cy08I
A T G A C A C C C G T A C A T T T C A G C T T T A G C T C A Cy09I
A T G A C A C C C G T A C A T T T C A G C T T T A G C T C A Cy10I
A T G A C A C C C G T A C A T T T C A G C T T T A G C T C A Cy01M
A T G A C A C C C G T A C A T T T C A G C T T T A G C T C A Cy02M
A T G A C A C C C G T A C A T T T C A G C T T T A G C T C A Cy03M
A T G A C A C C C G T A C A T T T C A G C T T T A G C T C A Cy04M
A T G A C A C C C G T A C A T T T C A G C T T T A G C T C A Cy05M
A T G A C A C C C G T A C A T T T C A G C T T T A G C T C A Cy06M
A T G A C A C C C G T A C A T T T C A G C T T T A G C T C A Cy07M
A T G A C A C C C G T A C A T T T C A G C T T T A G C T C A Cy08M
A T G A C A C C C G T A C A T T T C A G C T T T A G C T C A Cy09M
A T G A C A C C C G T A C A T T T C A G C T T T A G C T C A Cy10M
A T G A C A C C C G T A C A T T T C A G C T T T A G C T C A Cy GB

G C A T T C A T T T T A G G T C T A A T G G G A C T A G C A
                  40                  50                  60
G C A T T C A T T T T A G G T C T A A T G G G A C T A G C A Cy01I
G C A T T C A T T T T A G G T C T A A T G G G A C T A G C A Cy02I
G C A T T C A T T T T A G G T C T A A T G G G A C T A G C A Cy03I
G C A T T C A T T T T A G G T C T A A T G G G A C T A G C A Cy04I
G C A T T C A T T T T A G G T C T A A T G G G A C T A G C A Cy05I
G C A T T C A T T T T A G G T C T A A T G G G A C T A G C A Cy06I
G C A T T C A T T T T A G G T C T A A T G G G A C T A G C A Cy07I
G C A T T C A T T T T A G G T C T A A T G G G A C T A G C A Cy08I
G C A T T C A T T T T A G G T C T A A T G G G A C T A G C A Cy09I
G C A T T C A T T T T A G G T C T A A T G G G A C T A G C A Cy10I
G C A T T C A T T T T A G G T C T A A T G G G A C T A G C A Cy01M
G C A T T C A T T T T A G G T C T A A T G G G A C T A G C A Cy02M
G C A T T C A T T T T A G G T C T A A T G G G A C T A G C A Cy03M
G C A T T C A T T T T A G G T C T A A T G G G A C T A G C A Cy04M
G C A T T C A T T T T A G G T C T A A T G G G A C T A G C A Cy05M
G C A T T C A T T T T A G G T C T A A T G G G A C T A G C A Cy06M
G C A T T C A T T T T A G G T C T A A T G G G A C T A G C A Cy07M
G C A T T C A T T T T A G G T C T A A T G G G A C T A G C A Cy08M
G C A T T C A T T T T A G G T C T A A T G G G A C T A G C A Cy09M
G C A T T C A T T T T A G G T C T A A T G G G A C T A G C A Cy10M
G C A T T C A T T T T A G G T C T A A T G G G A C T A G C A Cy GB
```

BCU IAȘI

```
T T C C A C C G A A C C C A C C T A C T C T C C G C G C T A  Majority
                    70                  80                  90
T T C C A C C G A A C C C A C C T A C T C T C C G C G C T A  Cy01I
T T C C A C C G A A C C C A C C T A C T C T C C G C G C T A  Cy02I
T T C C A C C G A A C C C A C C T A C T C T C C G C G C T A  Cy03I
T T C C A C C G A A C C C A C C T A C T C T C C G C G C T A  Cy04I
T T C C A C C G A A C C C A C C T A C T C T C C G C G C T A  Cy05I
T T C C A C C G A A C C C A C C T A C T C T C C G C G C T A  Cy06I
T T C C A C C G A A C C C A C C T A C T C T C C G C G C T A  Cy07I
T T C C A C C G A A C C C A C C T A C T C T C C G C G C T A  Cy08I
T T C C A C C G A A C C C A C C T A C T C T C C G C G C T A  Cy09I
T T C C A C C G A A C C C A C C T A C T C T C C G C G C T A  Cy10I
T T C C A C C G A A C C C A C C T A C T C T C C G C G C T A  Cy01M
T T C C A C C G A A C C C A C C T A C T C T C C G C G C T A  Cy02M
T T C C A C C G A A C C C A C C T A C T C T C C G C G C T A  Cy03M
T T C C A C C G A A C C C A C C T A C T C T C C G C G C T A  Cy04M
T T C C A C C G A A C C C A C C T A C T C T C C G C G C T A  Cy05M
T T C C A C C G A A C C C A C C T A C T C T C C G C G C T A  Cy06M
T T C C A C C G A A C C C A C C T A C T C T C C G C G C T A  Cy07M
T T C C A C C G A A C C C A C C T A C T C T C C G C G C T A  Cy08M
T T C C A C C G A A C C C A C C T A C T C T C C G C G C T A  Cy09M
T T C C A C C G A A C C C A C C T A C T C T C C G C G C T A  Cy10M
T T C C A C C G A A C C C A C C T A C T C T C C G C G C T A  Cy GB

C T A T G C T T A G A A G G A A T A A T A C T G T C C C T A
                    100                 110                 120
C T A T G C T T A G A A G G A A T A A T A C T G T C C C T A  Cy01I
C T A T G C T T A G A A G G A A T A A T A C T G T C C C T A  Cy02I
C T A T G C T T A G A A G G A A T A A T A C T G T C C C T A  Cy03I
C T A T G C T T A G A A G G A A T A A T A C T G T C C C T A  Cy04I
C T A T G C T T A G A A G G A A T A A T A C T G T C C C T A  Cy05I
C T A T G C T T A G A A G G A A T A A T A C T G T C C C T A  Cy06I
C T A T G C T T A G A A G G A A T A A T A C T G T C C C T A  Cy07I
C T A T G C T T A G A A G G A A T A A T A C T G T C C C T A  Cy08I
C T A T G C T T A G A A G G A A T A A T A C T G T C C C T A  Cy09I
C T A T G C T T A G A A G G A A T A A T A C T G T C C C T A  Cy10I
C T A T G C T T A G A A G G A A T A A T A C T G T C C C T A  Cy01M
C T A T G C T T A G A A G G A A T A A T A C T G T C C C T A  Cy02M
C T A T G C T T A G A A G G A A T A A T A C T G T C C C T A  Cy03M
C T A T G C T T A G A A G G A A T A A T A C T G T C C C T A  Cy04M
C T A T G C T T A G A A G G A A T A A T A C T G T C C C T A  Cy05M
C T A T G C T T A G A A G G A A T A A T A C T G T C C C T A  Cy06M
C T A T G C T T A G A A G G A A T A A T A C T G T C C C T A  Cy07M
C T A T G C T T A G A A G G A A T A A T A C T G T C C C T A  Cy08M
C T A T G C T T A G A A G G A A T A A T A C T G T C C C T A  Cy09M
C T A T G C T T A G A A G G A A T A A T A C T G T C C C T A  Cy10M
C T A T G C T T A G A A G G A A T A A T A C T G T C C C T A  Cy GB
```

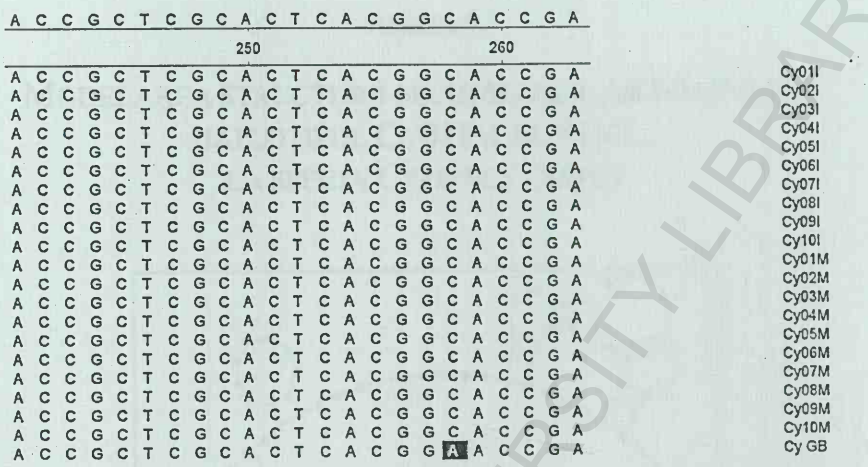
BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY



BCU IASI / CENTRUL DE DOCUMENTARE

```
A T A C T A C T A C T G G C C T T T T C T G C T T G T G A A
                    190                     200                     210
A T A C T A C T A C T G G C C T T T T C T G C T T G T G A A   Cy01I
A T A C T A C T A C T G G C C T T T T C T G C T T G T G A A   Cy02I
A T A C T A C T A C T G G C C T T T T C T G C T T G T G A A   Cy03I
A T A C T A C T A C T G G C C T T T T C T G C T T G T G A A   Cy04I
A T A C T A C T A C T G G C C T T T T C T G C T T G T G A A   Cy05I
A T A C T A C T A C T G G C C T T T T C T G C T T G T G A A   Cy06I
A T A C T A C T A C T G G C C T T T T C T G C T T G T G A A   Cy07I
A T A C T A C T A C T G G C C T T T T C T G C T T G T G A A   Cy08I
A T A C T A C T A C T G G C C T T T T C T G C T T G T G A A   Cy09I
A T A C T A C T A C T G G C C T T T T C T G C T T G T G A A   Cy10I
A T A C T A C T A C T G G C C T T T T C T G C T T G T G A A   Cy01M
A T A C T A C T A C T G G C C T T T T C T G C T T G T G A A   Cy02M
A T A C T A C T A C T G G C C T T T T C T G C T T G T G A A   Cy03M
A T A C T A C T A C T G G C C T T T T C T G C T T G T G A A   Cy04M
A T A C T A C T A C T G G C C T T T T C T G C T T G T G A A   Cy05M
A T A C T A C T A C T G G C C T T T T C T G C T T G T G A A   Cy06M
A T A C T A C T A C T G G C C T T T T C T G C T T G T G A A   Cy07M
A T A C T A C T A C T G G C C T T T T C T G C T T G T G A A   Cy08M
A T A C T A C T A C T G G C C T T T T C T G C T T G T G A A   Cy09M
A T A C T A C T A C T G G C C T T T T C T G C T T G T G A A   Cy10M
A T A C T A C T A C T G G C C T T T T C T G C T T G T G A A   Cy GB

G C T A G C A C C G G C T T A G C A C T T T T A G T T G C T
                    220                     230                     240
G C T A G C A C C G G C T T A G C A C T T T T A G T T G C T   Cy01I
G C T A G C A C C G G C T T A G C A C T T T T A G T T G C T   Cy02I
G C T A G C A C C G G C T T A G C A C T T T T A G T T G C T   Cy03I
G C T A G C A C C G G C T T A G C A C T T T T A G T T G C T   Cy04I
G C T A G C A C C G G C T T A G C A C T T T T A G T T G C T   Cy05I
G C T A G C A C C G G C T T A G C A C T T T T A G T T G C T   Cy06I
G C T A G C A C C G G C T T A G C A C T T T T A G T T G C T   Cy07I
G C T A G C A C C G G C T T A G C A C T T T T A G T T G C T   Cy08I
G C T A G C A C C G G C T T A G C A C T T T T A G T T G C T   Cy09I
G C T A G C A C C G G C T T A G C A C T T T T A G T T G C T   Cy10I
G C T A G C A C C G G C T T A G C A C T T T T A G T T G C T   Cy01M
G C T A G C A C C G G C T T A G C A C T T T T A G T T G C T   Cy02M
G C T A G C A C C G G C T T A G C A C T T T T A G T T G C T   Cy03M
G C T A G C A C C G G C T T A G C A C T T T T A G T T G C T   Cy04M
G C T A G C A C C G G C T T A G C A C T T T T A G T T G C T   Cy05M
G C T A G C A C C G G C T T A G C A C T T T T A G T T G C T   Cy06M
G C T A G C A C C G G C T T A G C A C T T T T A G T T G C T   Cy07M
G C T A G C A C C G G C T T A G C A C T T T T A G T T G C T   Cy08M
G C T A G C A C C G G C T T A G C A C T T T T A G T T G C T   Cy09M
G C T A G C A C C G G C T T A G C A C T T T T A G T T G C T   Cy10M
G C T A G C A C C G G C T T A G C A C T T T T A G T T G C T   Cy GB
```

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

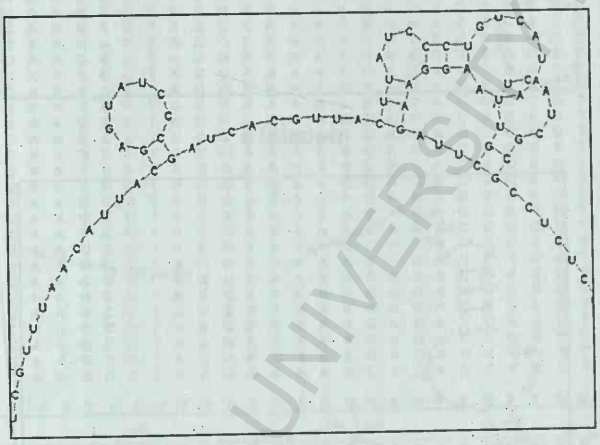


(Cy01I=*Cyprinus carpio* populația Iași, Cy01M= *Cyprinus carpio*, populația Movileni)

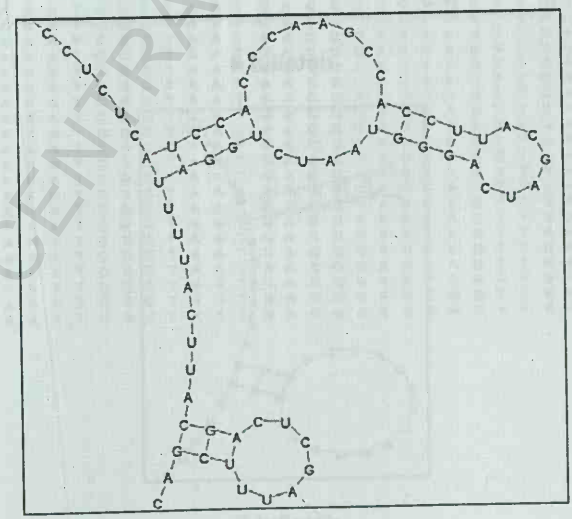
BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

ANEXA 9

MODELAREA STRUCTURII SECUNDARE A ARNM PENTRU HAPLOTIPUL CY01IM AL ND4L, LA SPECIA *CYPRINUS CARPIO*

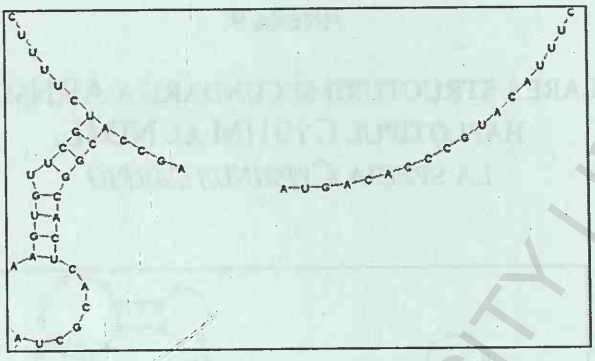


detaliul 1

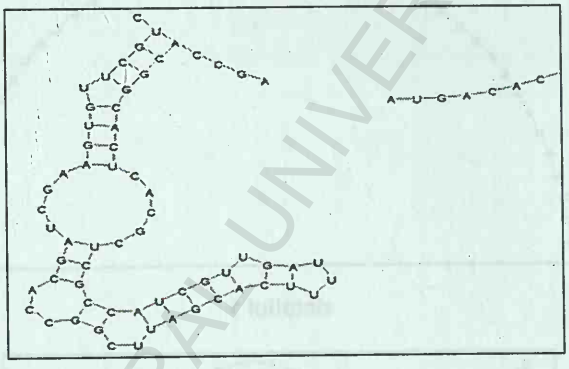


detaliul 2

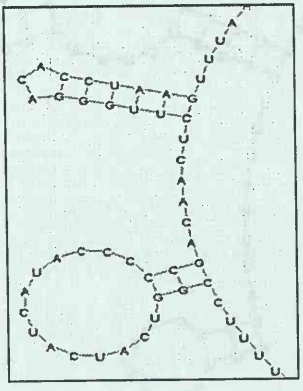
BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY



detaliul 3



detaliul 4

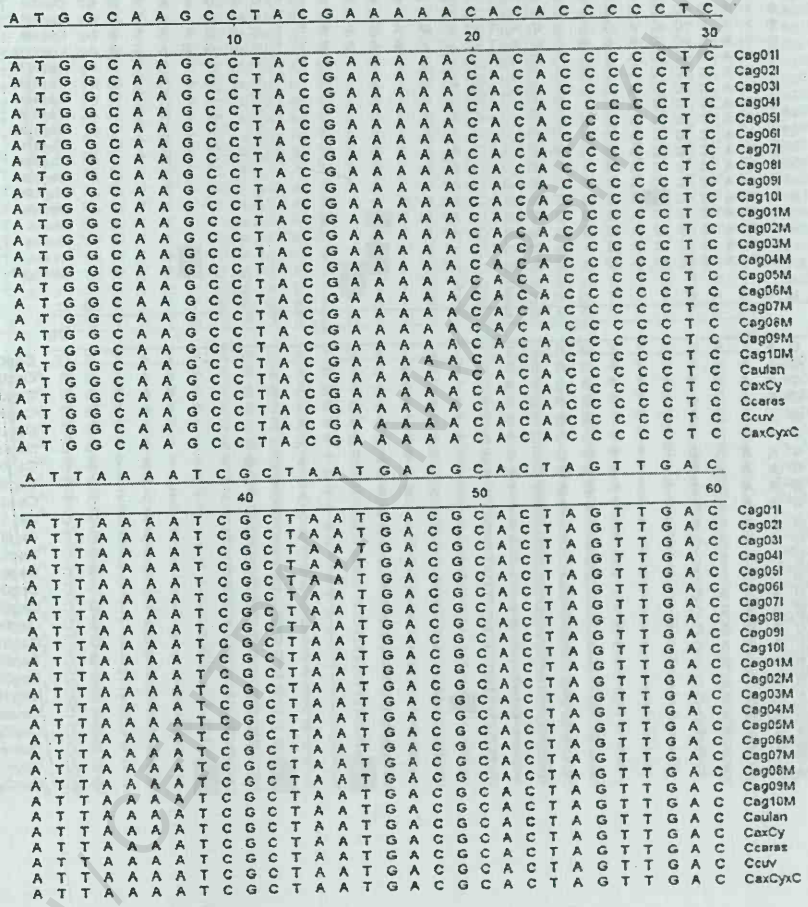


detaliul 5

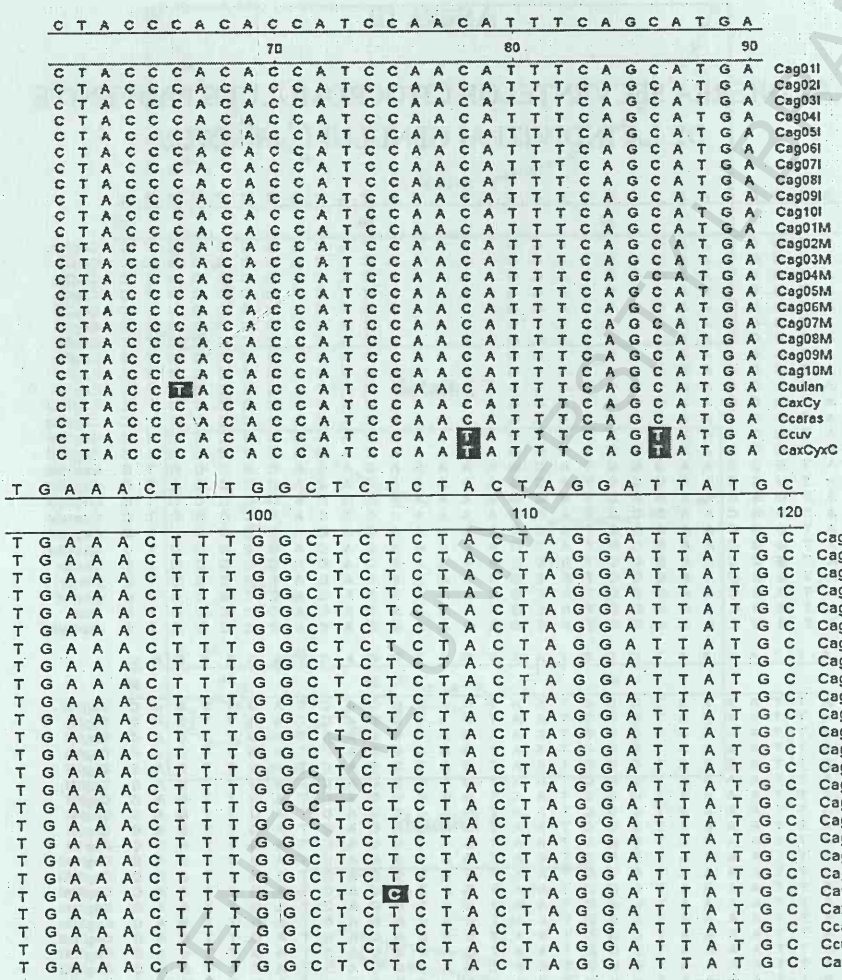
BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

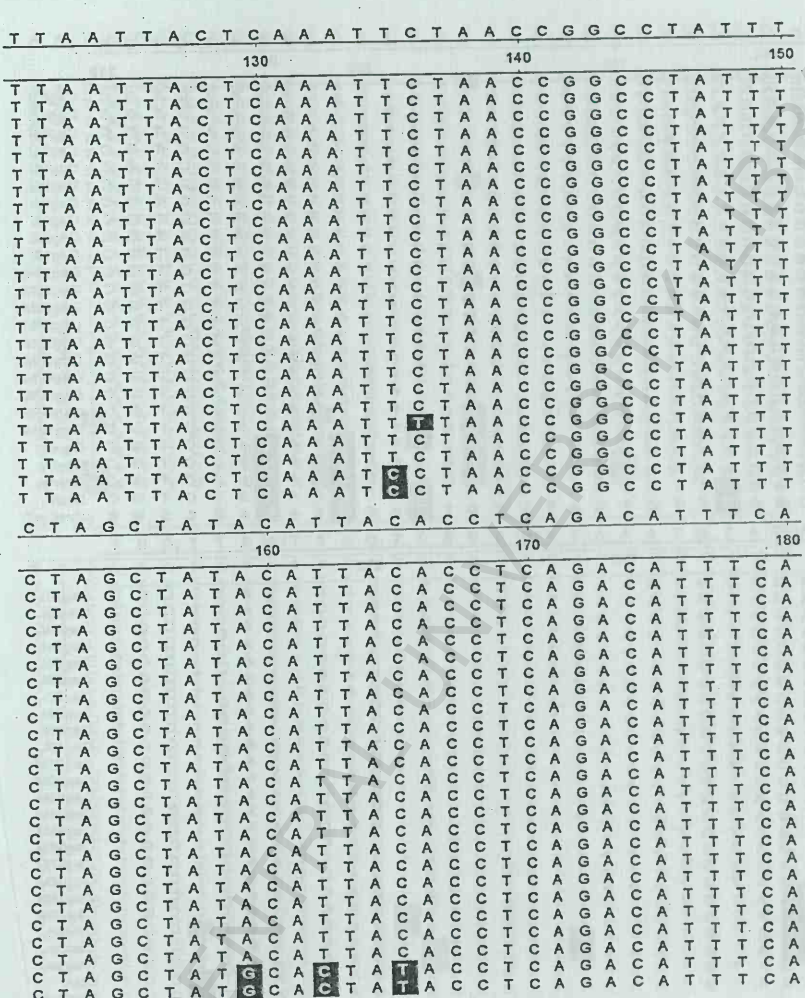
ANEXA 10

ALINIEREA SECVENȚELOR CITOCROMULUI B PROVENITE DE LA INDIVIZI AI GENULUI *CARASSIUS*

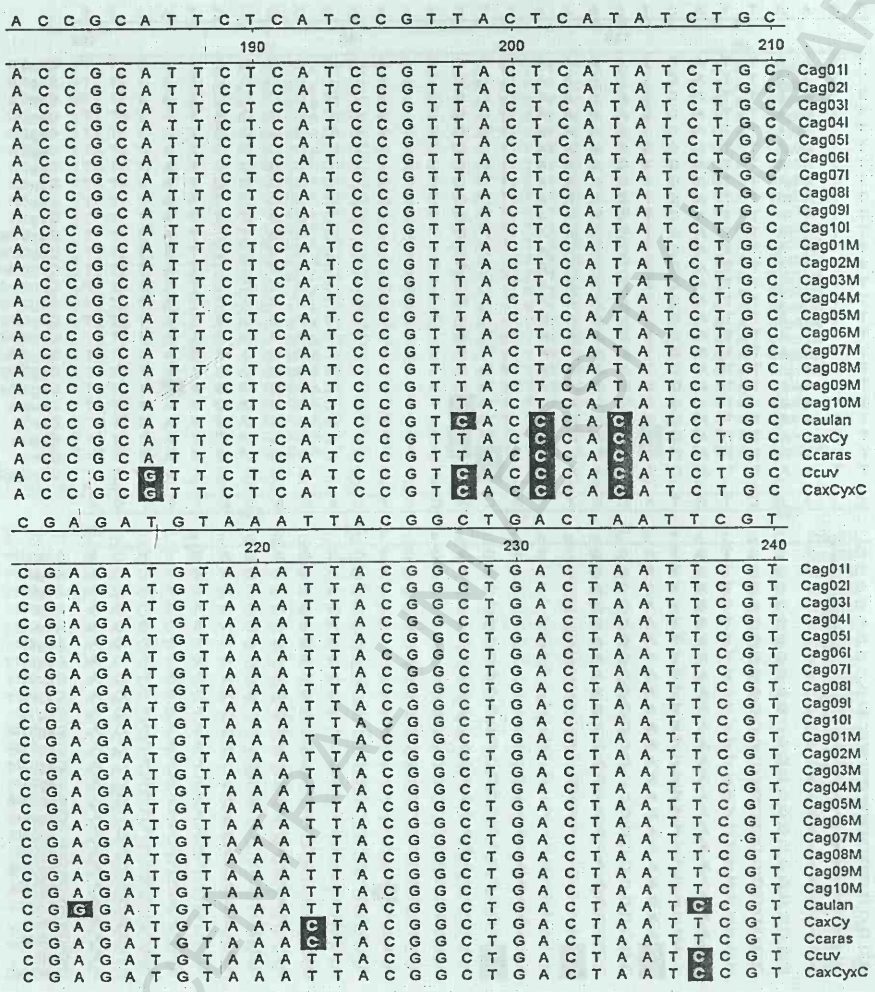


BCU IASI

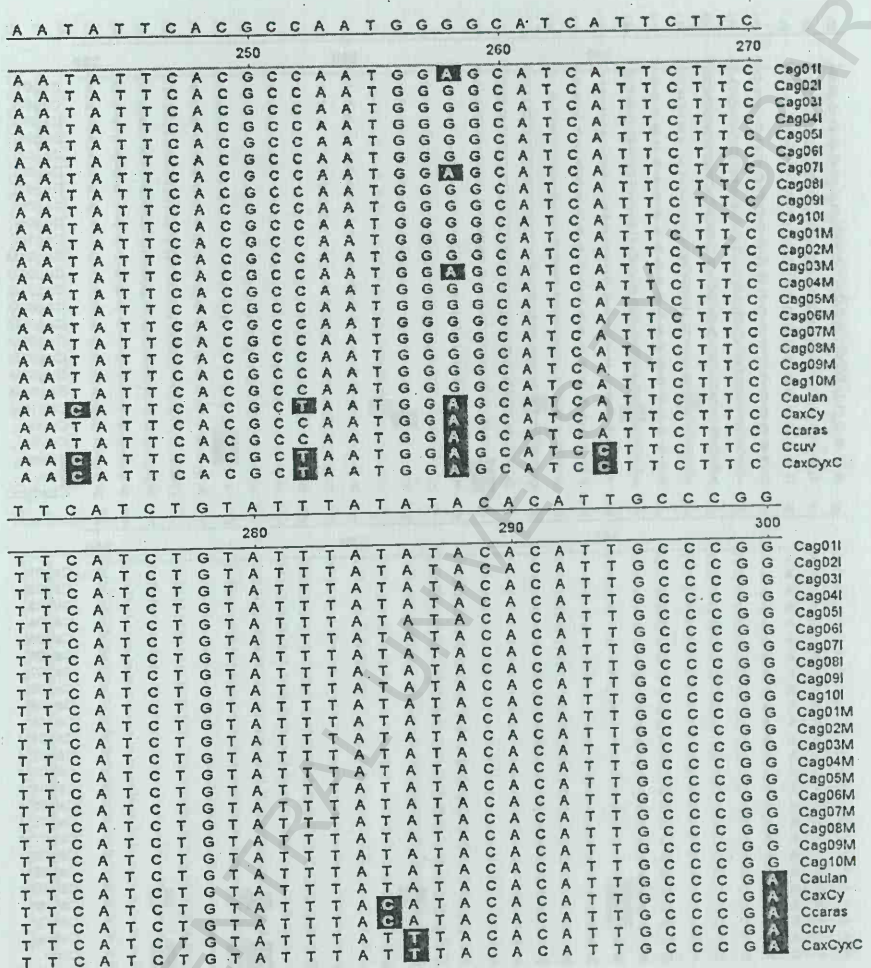

70
80
90
100
110
120
Cag01I
Cag02I
Cag03I
Cag04I
Cag05I
Cag06I
Cag07I
Cag08I
Cag09I
Cag10I
Cag01M
Cag02M
Cag03M
Cag04M
Cag05M
Cag06M
Cag07M
Cag08M
Cag09M
Cag10M
Caulan
CaxCy
Ccaras
Ccuv
CaxCyxC



BCU IASI / CENTRE DE DOCUMENTARE

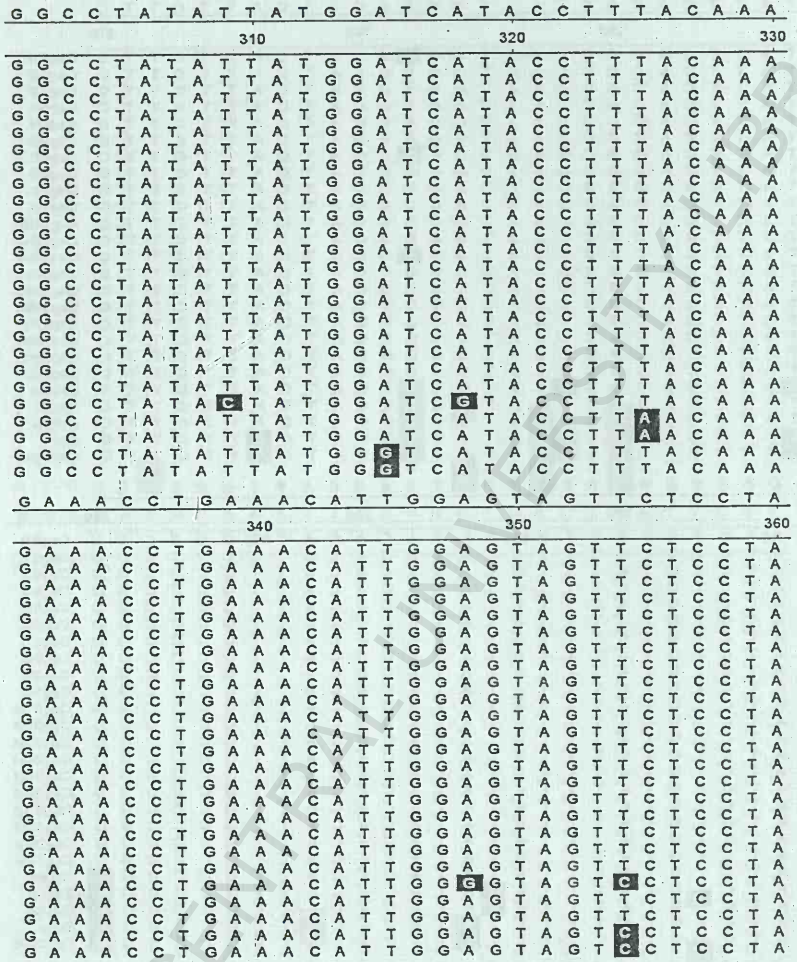


BCU IASI / COLECTIA UNIVERSITARA

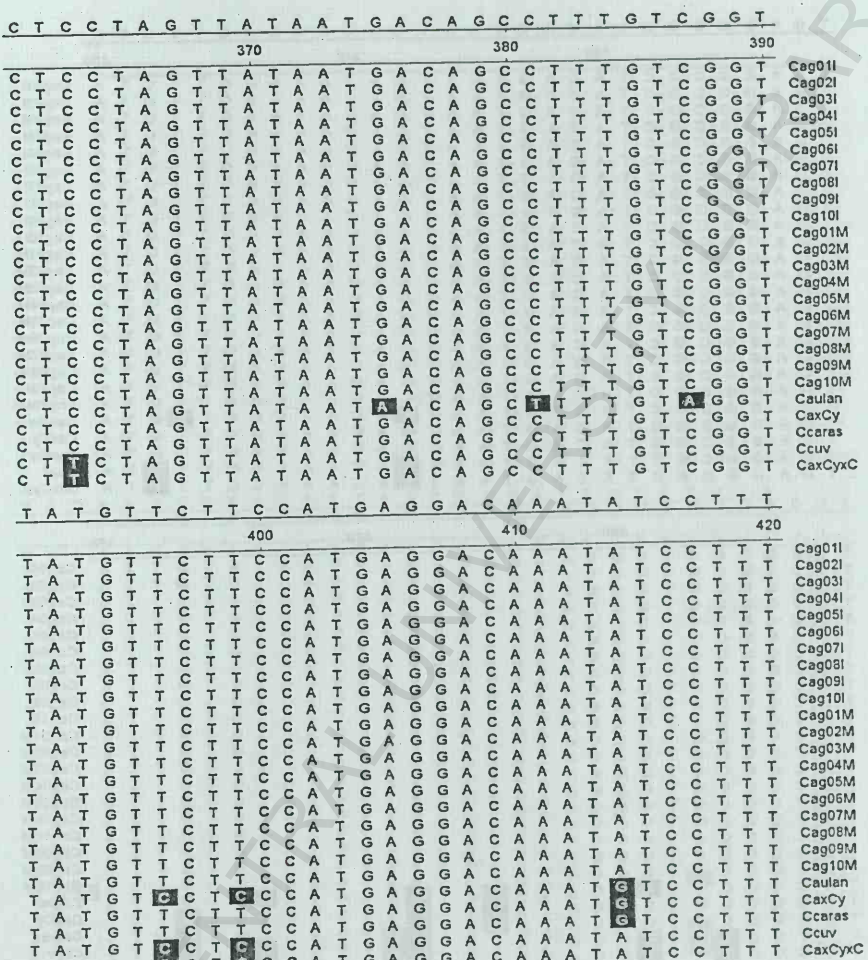


```
A A T A T T C A C G C C A A T G G G G C A T C A T T C T T C
                    250                 260                 270
A A T A T T C A C G C C A A T G G A G C A T C A T T C T T C   Cag01I
A A T A T T C A C G C C A A T G G G G C A T C A T T C T T C   Cag02I
A A T A T T C A C G C C A A T G G G G C A T C A T T C T T C   Cag03I
A A T A T T C A C G C C A A T G G G G C A T C A T T C T T C   Cag04I
A A T A T T C A C G C C A A T G G G G C A T C A T T C T T C   Cag05I
A A T A T T C A C G C C A A T G G G G C A T C A T T C T T C   Cag06I
A A T A T T C A C G C C A A T G G A G C A T C A T T C T T C   Cag07I
A A T A T T C A C G C C A A T G G G G C A T C A T T C T T C   Cag08I
A A T A T T C A C G C C A A T G G G G C A T C A T T C T T C   Cag09I
A A T A T T C A C G C C A A T G G G G C A T C A T T C T T C   Cag10I
A A T A T T C A C G C C A A T G G G G C A T C A T T C T T C   Cag01M
A A T A T T C A C G C C A A T G G G G C A T C A T T C T T C   Cag02M
A A T A T T C A C G C C A A T G G A G C A T C A T T C T T C   Cag03M
A A T A T T C A C G C C A A T G G G G C A T C A T T C T T C   Cag04M
A A T A T T C A C G C C A A T G G G G C A T C A T T C T T C   Cag05M
A A T A T T C A C G C C A A T G G G G C A T C A T T C T T C   Cag06M
A A T A T T C A C G C C A A T G G G G C A T C A T T C T T C   Cag07M
A A T A T T C A C G C C A A T G G G G C A T C A T T C T T C   Cag08M
A A T A T T C A C G C C A A T G G G G C A T C A T T C T T C   Cag09M
A A T A T T C A C G C C A A T G G G G C A T C A T T C T T C   Cag10M
A A C A T T C A C G C T A A T G G A G C A T C A T T C T T C   Caulan
A A T A T T C A C G C C A A T G G A G C A T C A T T C T T C   CaxCy
A A T A T T C A C G C C A A T G G A G C A T C A T T C T T C   Ccaras
A A C A T T C A C G C T A A T G G A G C A T C C T T C T T C   Ccuv
A A C A T T C A C G C T A A T G G A G C A T C C T T C T T C   CaxCyxC

T T C A T C T G T A T T T A T A T A C A C A T T G C C C G G
                    280                 290                 300
T T C A T C T G T A T T T A T A T A C A C A T T G C C C G G   Cag01I
T T C A T C T G T A T T T A T A T A C A C A T T G C C C G G   Cag02I
T T C A T C T G T A T T T A T A T A C A C A T T G C C C G G   Cag03I
T T C A T C T G T A T T T A T A T A C A C A T T G C C C G G   Cag04I
T T C A T C T G T A T T T A T A T A C A C A T T G C C C G G   Cag05I
T T C A T C T G T A T T T A T A T A C A C A T T G C C C G G   Cag06I
T T C A T C T G T A T T T A T A T A C A C A T T G C C C G G   Cag07I
T T C A T C T G T A T T T A T A T A C A C A T T G C C C G G   Cag08I
T T C A T C T G T A T T T A T A T A C A C A T T G C C C G G   Cag09I
T T C A T C T G T A T T T A T A T A C A C A T T G C C C G G   Cag10I
T T C A T C T G T A T T T A T A T A C A C A T T G C C C G G   Cag01M
T T C A T C T G T A T T T A T A T A C A C A T T G C C C G G   Cag02M
T T C A T C T G T A T T T A T A T A C A C A T T G C C C G G   Cag03M
T T C A T C T G T A T T T A T A T A C A C A T T G C C C G G   Cag04M
T T C A T C T G T A T T T A T A T A C A C A T T G C C C G G   Cag05M
T T C A T C T G T A T T T A T A T A C A C A T T G C C C G G   Cag06M
T T C A T C T G T A T T T A T A T A C A C A T T G C C C G G   Cag07M
T T C A T C T G T A T T T A T A T A C A C A T T G C C C G G   Cag08M
T T C A T C T G T A T T T A T A T A C A C A T T G C C C G G   Cag09M
T T C A T C T G T A T T T A T A T A C A C A T T G C C C G G   Cag10M
T T C A T C T G T A T T T A T A T A C A C A T T G C C C G A   Caulan
T T C A T C T G T A T T T A C A T A C A C A T T G C C C G A   CaxCy
T T C A T C T G T A T T T A C A T A C A C A T T G C C C G A   Ccaras
T T C A T C T G T A T T T A T T T A C A C A T T G C C C G A   Ccuv
T T C A T C T G T A T T T A T T T A C A C A T T G C C C G A   CaxCyxC
```

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

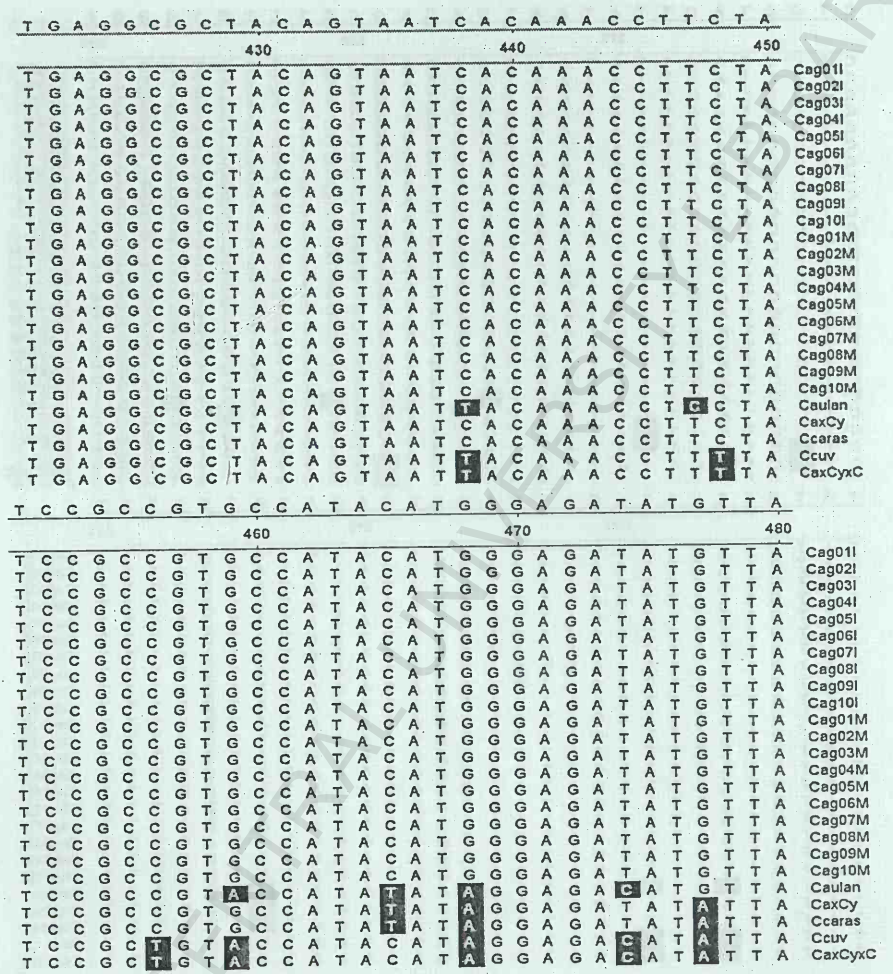


BCU IASI / CENTRUL DE INFORMARE

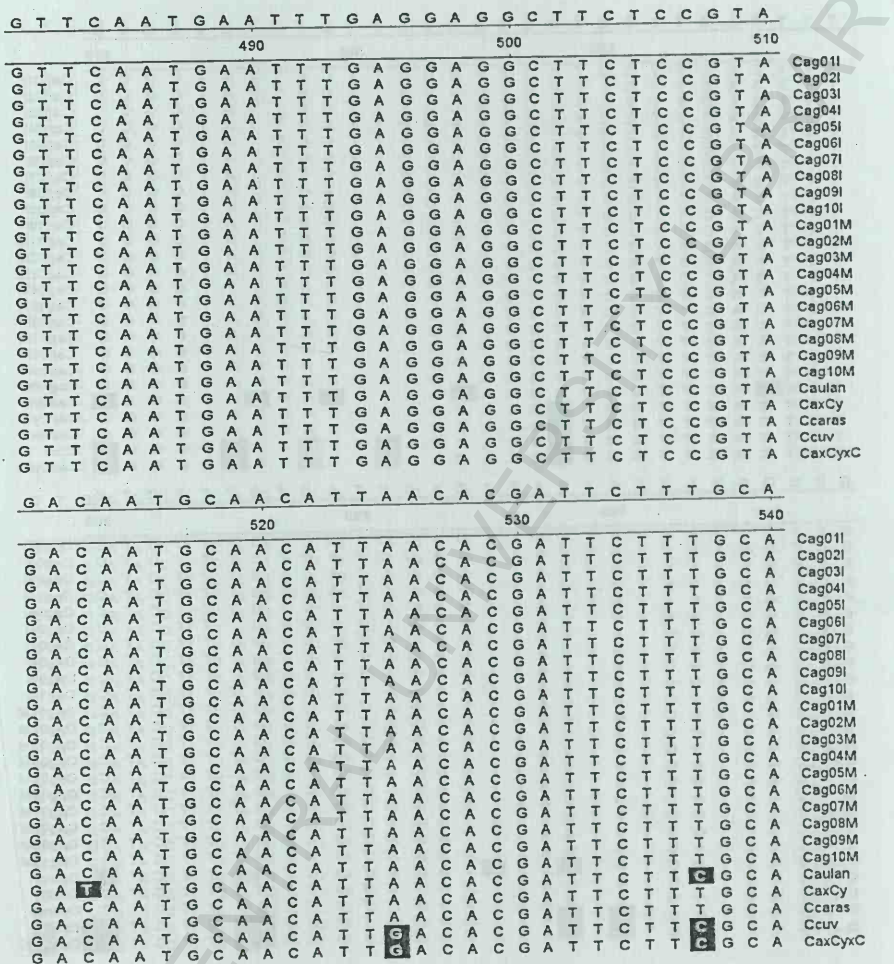


```
C T C C T A G T T A T A A T G A C A G C C T T T G T C G G T
                    370                 380                 390
C T C C T A G T T A T A A T G A C A G C C T T T G T C G G T   Cag01I
C T C C T A G T T A T A A T G A C A G C C T T T G T C G G T   Cag02I
C T C C T A G T T A T A A T G A C A G C C T T T G T C G G T   Cag03I
C T C C T A G T T A T A A T G A C A G C C T T T G T C G G T   Cag04I
C T C C T A G T T A T A A T G A C A G C C T T T G T C G G T   Cag05I
C T C C T A G T T A T A A T G A C A G C C T T T G T C G G T   Cag06I
C T C C T A G T T A T A A T G A C A G C C T T T G T C G G T   Cag07I
C T C C T A G T T A T A A T G A C A G C C T T T G T C G G T   Cag08I
C T C C T A G T T A T A A T G A C A G C C T T T G T C G G T   Cag09I
C T C C T A G T T A T A A T G A C A G C C T T T G T C G G T   Cag10I
C T C C T A G T T A T A A T G A C A G C C T T T G T C G G T   Cag01M
C T C C T A G T T A T A A T G A C A G C C T T T G T C G G T   Cag02M
C T C C T A G T T A T A A T G A C A G C C T T T G T C G G T   Cag03M
C T C C T A G T T A T A A T G A C A G C C T T T G T C G G T   Cag04M
C T C C T A G T T A T A A T G A C A G C C T T T G T C G G T   Cag05M
C T C C T A G T T A T A A T G A C A G C C T T T G T C G G T   Cag06M
C T C C T A G T T A T A A T G A C A G C C T T T G T C G G T   Cag07M
C T C C T A G T T A T A A T G A C A G C C T T T G T C G G T   Cag08M
C T C C T A G T T A T A A T G A C A G C C T T T G T C G G T   Cag09M
C T C C T A G T T A T A A T G A C A G C C T T T G T C G G T   Cag10M
C T C C T A G T T A T A A T A A C A G C T T T T G T A G G T   Caulan
C T C C T A G T T A T A A T G A C A G C C T T T G T C G G T   CaxCy
C T C C T A G T T A T A A T G A C A G C C T T T G T C G G T   Ccaras
C T T C T A G T T A T A A T G A C A G C C T T T G T C G G T   Ccuv
C T T C T A G T T A T A A T G A C A G C C T T T G T C G G T   CaxCyxC

T A T G T T C T T C C A T G A G G A C A A A T A T C C T T T
                    400                 410                 420
T A T G T T C T T C C A T G A G G A C A A A T A T C C T T T   Cag01I
T A T G T T C T T C C A T G A G G A C A A A T A T C C T T T   Cag02I
T A T G T T C T T C C A T G A G G A C A A A T A T C C T T T   Cag03I
T A T G T T C T T C C A T G A G G A C A A A T A T C C T T T   Cag04I
T A T G T T C T T C C A T G A G G A C A A A T A T C C T T T   Cag05I
T A T G T T C T T C C A T G A G G A C A A A T A T C C T T T   Cag06I
T A T G T T C T T C C A T G A G G A C A A A T A T C C T T T   Cag07I
T A T G T T C T T C C A T G A G G A C A A A T A T C C T T T   Cag08I
T A T G T T C T T C C A T G A G G A C A A A T A T C C T T T   Cag09I
T A T G T T C T T C C A T G A G G A C A A A T A T C C T T T   Cag10I
T A T G T T C T T C C A T G A G G A C A A A T A T C C T T T   Cag01M
T A T G T T C T T C C A T G A G G A C A A A T A T C C T T T   Cag02M
T A T G T T C T T C C A T G A G G A C A A A T A T C C T T T   Cag03M
T A T G T T C T T C C A T G A G G A C A A A T A T C C T T T   Cag04M
T A T G T T C T T C C A T G A G G A C A A A T A T C C T T T   Cag05M
T A T G T T C T T C C A T G A G G A C A A A T A T C C T T T   Cag06M
T A T G T T C T T C C A T G A G G A C A A A T A T C C T T T   Cag07M
T A T G T T C T T C C A T G A G G A C A A A T A T C C T T T   Cag08M
T A T G T T C T T C C A T G A G G A C A A A T A T C C T T T   Cag09M
T A T G T T C T T C C A T G A G G A C A A A T A T C C T T T   Cag10M
T A T G T C C T C C C A T G A G G A C A A A T G T C C T T T   Caulan
T A T G T T C T T C C A T G A G G A C A A A T G T C C T T T   CaxCy
T A T G T T C T T C C A T G A G G A C A A A T G T C C T T T   Ccaras
T A T G T C C T C C C A T G A G G A C A A A T A T C C T T T   Ccuv
T A T G T C C T C C C A T G A G G A C A A A T A T C C T T T   CaxCyxC
```

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY



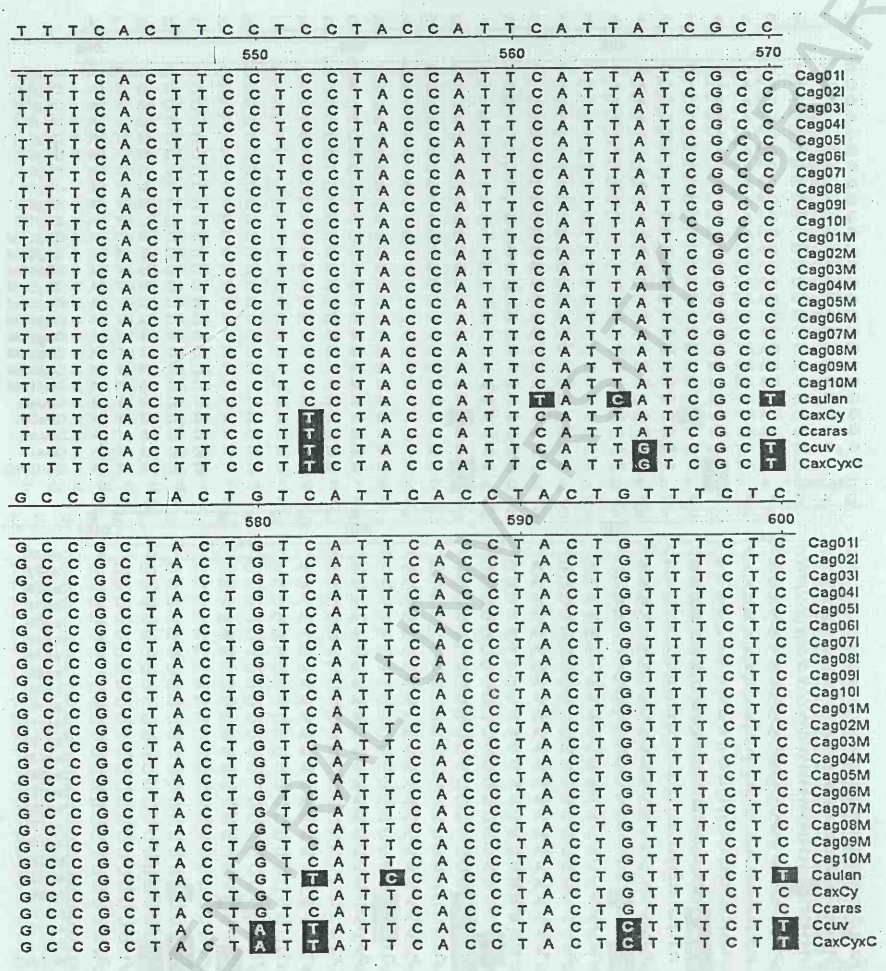
BCU IASI / CLUJ UNIVERSITARA



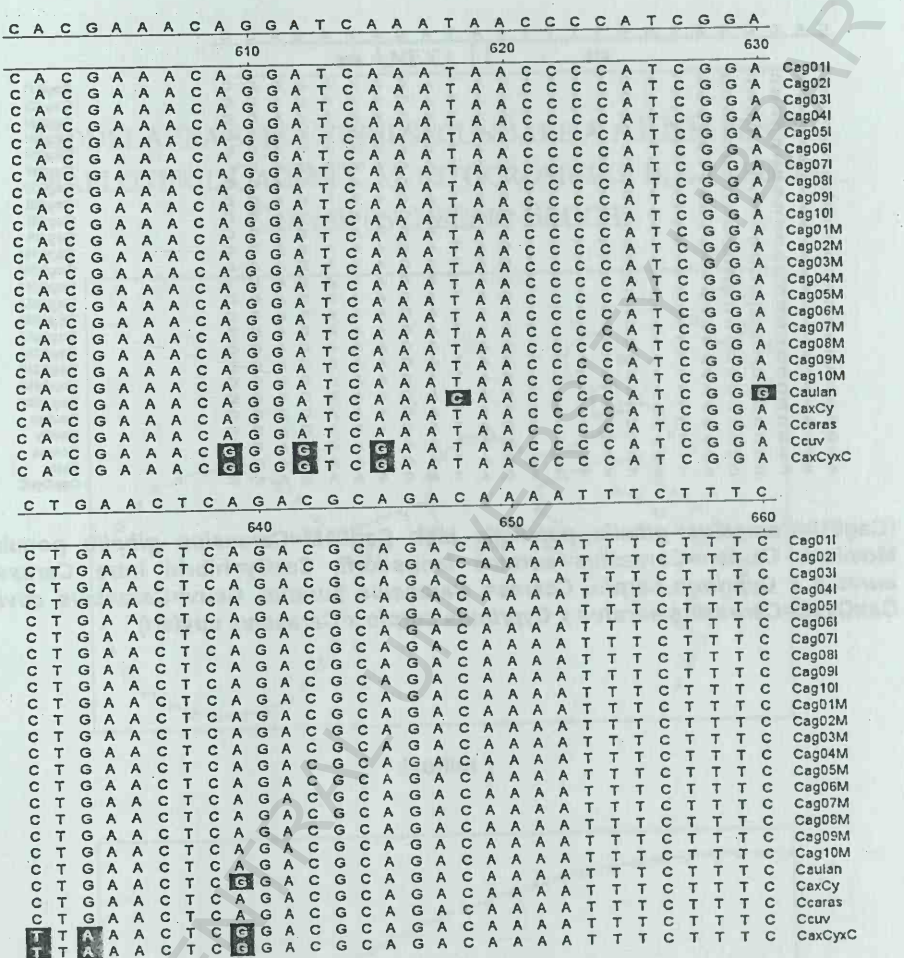
G	T	T	C	A	A	T	G	A	A	T	T	T	G	A	G	G	A	G	G	C	T	T	C	T	C	C	G	T	A		
									490										500										510		
G	T	T	C	A	A	T	G	A	A	T	T	T	G	A	G	G	A	G	G	C	T	T	C	T	C	C	G	T	A	Cag01I
G	T	T	C	A	A	T	G	A	A	T	T	T	G	A	G	G	A	G	G	C	T	T	C	T	C	C	G	T	A	Cag02I
G	T	T	C	A	A	T	G	A	A	T	T	T	G	A	G	G	A	G	G	C	T	T	C	T	C	C	G	T	A	Cag03I
G	T	T	C	A	A	T	G	A	A	T	T	T	G	A	G	G	A	G	G	C	T	T	C	T	C	C	G	T	A	Cag04I
G	T	T	C	A	A	T	G	A	A	T	T	T	G	A	G	G	A	G	G	C	T	T	C	T	C	C	G	T	A	Cag05I
G	T	T	C	A	A	T	G	A	A	T	T	T	G	A	G	G	A	G	G	C	T	T	C	T	C	C	G	T	A	Cag06I
G	T	T	C	A	A	T	G	A	A	T	T	T	G	A	G	G	A	G	G	C	T	T	C	T	C	C	G	T	A	Cag07I
G	T	T	C	A	A	T	G	A	A	T	T	T	G	A	G	G	A	G	G	C	T	T	C	T	C	C	G	T	A	Cag08I
G	T	T	C	A	A	T	G	A	A	T	T	T	G	A	G	G	A	G	G	C	T	T	C	T	C	C	G	T	A	Cag09I
G	T	T	C	A	A	T	G	A	A	T	T	T	G	A	G	G	A	G	G	C	T	T	C	T	C	C	G	T	A	Cag10I
G	T	T	C	A	A	T	G	A	A	T	T	T	G	A	G	G	A	G	G	C	T	T	C	T	C	C	G	T	A	Cag01M
G	T	T	C	A	A	T	G	A	A	T	T	T	G	A	G	G	A	G	G	C	T	T	C	T	C	C	G	T	A	Cag02M
G	T	T	C	A	A	T	G	A	A	T	T	T	G	A	G	G	A	G	G	C	T	T	C	T	C	C	G	T	A	Cag03M
G	T	T	C	A	A	T	G	A	A	T	T	T	G	A	G	G	A	G	G	C	T	T	C	T	C	C	G	T	A	Cag04M
G	T	T	C	A	A	T	G	A	A	T	T	T	G	A	G	G	A	G	G	C	T	T	C	T	C	C	G	T	A	Cag05M
G	T	T	C	A	A	T	G	A	A	T	T	T	G	A	G	G	A	G	G	C	T	T	C	T	C	C	G	T	A	Cag06M
G	T	T	C	A	A	T	G	A	A	T	T	T	G	A	G	G	A	G	G	C	T	T	C	T	C	C	G	T	A	Cag07M
G	T	T	C	A	A	T	G	A	A	T	T	T	G	A	G	G	A	G	G	C	T	T	C	T	C	C	G	T	A	Cag08M
G	T	T	C	A	A	T	G	A	A	T	T	T	G	A	G	G	A	G	G	C	T	T	C	T	C	C	G	T	A	Cag09M
G	T	T	C	A	A	T	G	A	A	T	T	T	G	A	G	G	A	G	G	C	T	T	C	T	C	C	G	T	A	Cag10M
G	T	T	C	A	A	T	G	A	A	T	T	T	G	A	G	G	A	G	G	C	T	T	C	T	C	C	G	T	A	Caulan
G	T	T	C	A	A	T	G	A	A	T	T	T	G	A	G	G	A	G	G	C	T	T	C	T	C	C	G	T	A	CaxCy
G	T	T	C	A	A	T	G	A	A	T	T	T	G	A	G	G	A	G	G	C	T	T	C	T	C	C	G	T	A	Ccaras
G	T	T	C	A	A	T	G	A	A	T	T	T	G	A	G	G	A	G	G	C	T	T	C	T	C	C	G	T	A	Ccuv
G	T	T	C	A	A	T	G	A	A	T	T	T	G	A	G	G	A	G	G	C	T	T	C	T	C	C	G	T	A	CaxCyxC

G	A	C	A	A	T	G	C	A	A	C	A	T	T	A	A	C	A	C	G	A	T	T	C	T	T	T	G	C	A		
									520										530										540		
G	A	C	A	A	T	G	C	A	A	C	A	T	T	A	A	C	A	C	G	A	T	T	C	T	T	T	G	C	A	Cag01I
G	A	C	A	A	T	G	C	A	A	C	A	T	T	A	A	C	A	C	G	A	T	T	C	T	T	T	G	C	A	Cag02I
G	A	C	A	A	T	G	C	A	A	C	A	T	T	A	A	C	A	C	G	A	T	T	C	T	T	T	G	C	A	Cag03I
G	A	C	A	A	T	G	C	A	A	C	A	T	T	A	A	C	A	C	G	A	T	T	C	T	T	T	G	C	A	Cag04I
G	A	C	A	A	T	G	C	A	A	C	A	T	T	A	A	C	A	C	G	A	T	T	C	T	T	T	G	C	A	Cag05I
G	A	C	A	A	T	G	C	A	A	C	A	T	T	A	A	C	A	C	G	A	T	T	C	T	T	T	G	C	A	Cag06I
G	A	C	A	A	T	G	C	A	A	C	A	T	T	A	A	C	A	C	G	A	T	T	C	T	T	T	G	C	A	Cag07I
G	A	C	A	A	T	G	C	A	A	C	A	T	T	A	A	C	A	C	G	A	T	T	C	T	T	T	G	C	A	Cag08I
G	A	C	A	A	T	G	C	A	A	C	A	T	T	A	A	C	A	C	G	A	T	T	C	T	T	T	G	C	A	Cag09I
G	A	C	A	A	T	G	C	A	A	C	A	T	T	A	A	C	A	C	G	A	T	T	C	T	T	T	G	C	A	Cag10I
G	A	C	A	A	T	G	C	A	A	C	A	T	T	A	A	C	A	C	G	A	T	T	C	T	T	T	G	C	A	Cag01M
G	A	C	A	A	T	G	C	A	A	C	A	T	T	A	A	C	A	C	G	A	T	T	C	T	T	T	G	C	A	Cag02M
G	A	C	A	A	T	G	C	A	A	C	A	T	T	A	A	C	A	C	G	A	T	T	C	T	T	T	G	C	A	Cag03M
G	A	C	A	A	T	G	C	A	A	C	A	T	T	A	A	C	A	C	G	A	T	T	C	T	T	T	G	C	A	Cag04M
G	A	C	A	A	T	G	C	A	A	C	A	T	T	A	A	C	A	C	G	A	T	T	C	T	T	T	G	C	A	Cag05M
G	A	C	A	A	T	G	C	A	A	C	A	T	T	A	A	C	A	C	G	A	T	T	C	T	T	T	G	C	A	Cag06M
G	A	C	A	A	T	G	C	A	A	C	A	T	T	A	A	C	A	C	G	A	T	T	C	T	T	T	G	C	A	Cag07M
G	A	C	A	A	T	G	C	A	A	C	A	T	T	A	A	C	A	C	G	A	T	T	C	T	T	T	G	C	A	Cag08M
G	A	C	A	A	T	G	C	A	A	C	A	T	T	A	A	C	A	C	G	A	T	T	C	T	T	T	G	C	A	Cag09M
G	A	C	A	A	T	G	C	A	A	C	A	T	T	A	A	C	A	C	G	A	T	T	C	T	T	T	G	C	A	Cag10M
G	A	T	A	A	T	G	C	A	A	C	A	T	T	A	A	C	A	C	G	A	T	T	C	T	T	C	G	C	A	Caulan
G	A	C	A	A	T	G	C	A	A	C	A	T	T	A	A	C	A	C	G	A	T	T	C	T	T	T	G	C	A	CaxCy
G	A	C	A	A	T	G	C	A	A	C	A	T	T	A	A	C	A	C	G	A	T	T	C	T	T	T	G	C	A	Ccaras
G	A	C	A	A	T	G	C	A	A	C	A	T	T	G	A	C	A	C	G	A	T	T	C	T	T	C	G	C	A	Ccuv
G	A	C	A	A	T	G	C	A	A	C	A	T	T	G	A	C	A	C	G	A	T	T	C	T	T	C	G	C	A	CaxCyxC

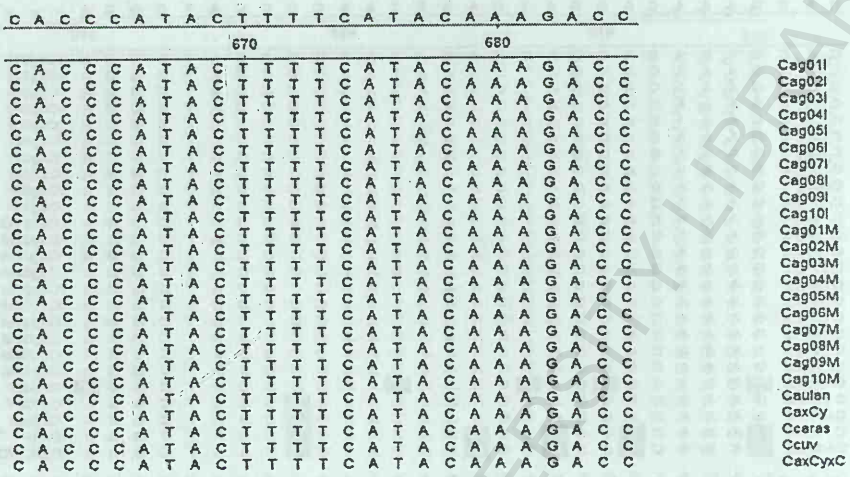
BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY



BCU IASI / CENTRUL DE CERCETARE



BCU IASI / CENTRUL DE DOCUMENTARE

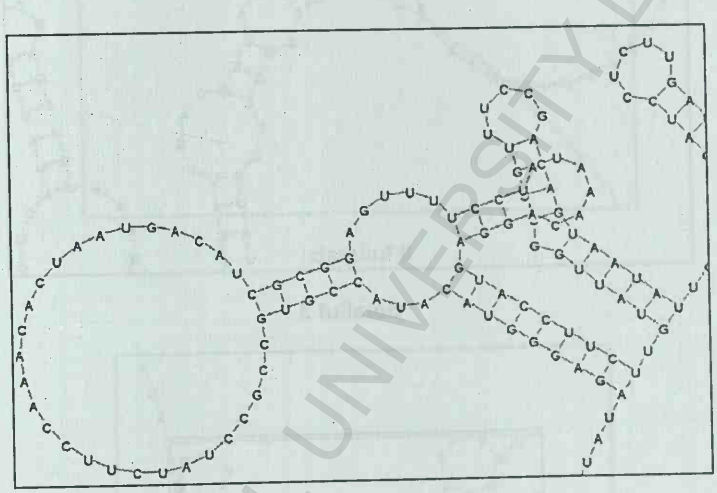


(Cag01I=*Carassius gibelio* populația Iași, Cag01M=*Carassius gibelio* populația Movileni, Caulan=*Carassius auratus langsdörfi*, CaxCy=hibrid între *Carassius auratus x Cyprinus carpio*, Ccaras= *Carassius auratus*, Ccuv=*Carassius cuvieri*, CaxCyxC=*Carassius auratus x Cyprinuis carpio x Carassius cuvieri*)

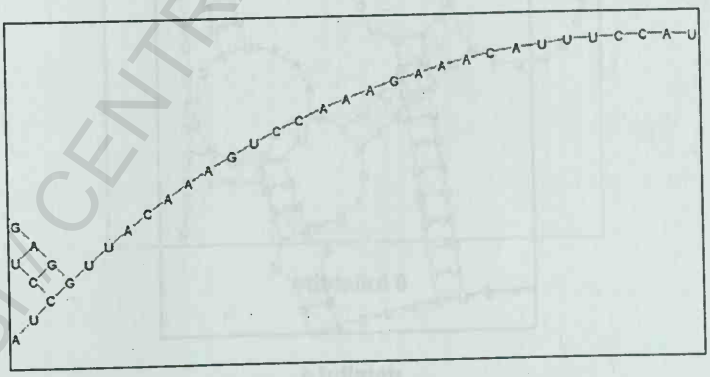
BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

ANEXA 11

MODELAREA STRUCTURII SECUNDARE A ARNM PENTRU HAPLOTIPUL CAGIMY AL CITOCROMULUI B, LA SPECIA *CARASSIUS GIBELIO* BLOCH

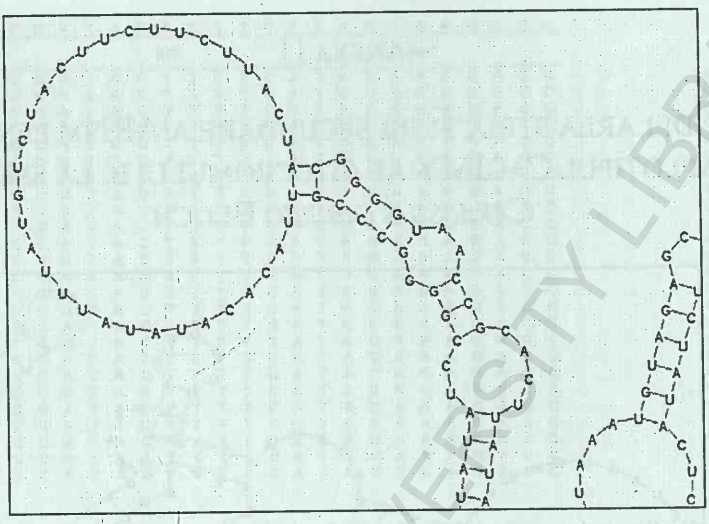


detaliul 1

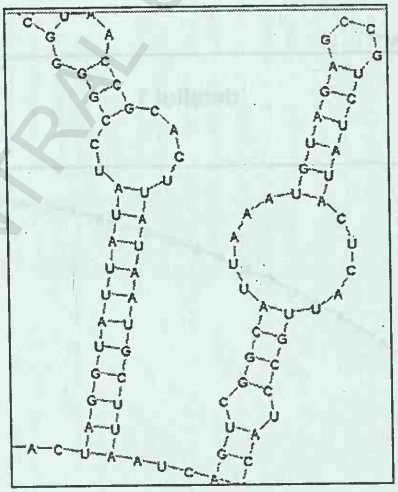


detaliul 2

BCU IASI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

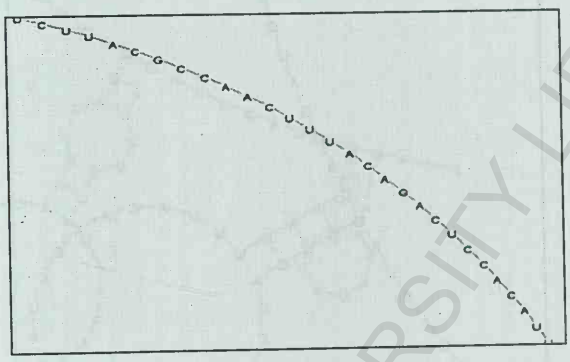


detaliul 3

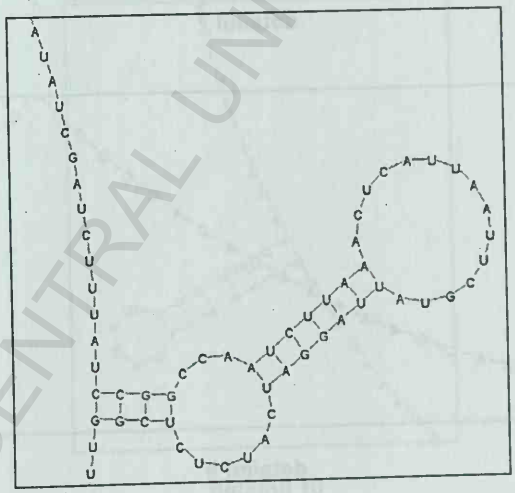


detaliul 4

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

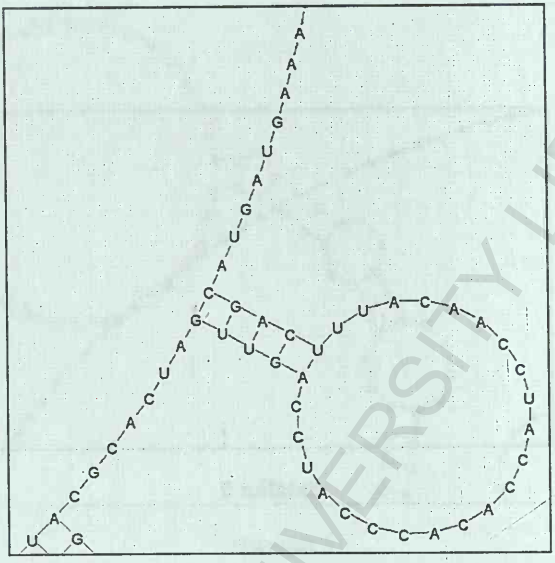


detaliul 5

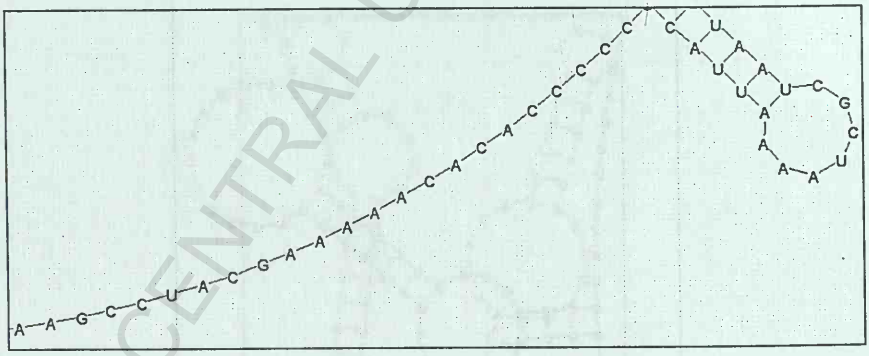


detaliul 6

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

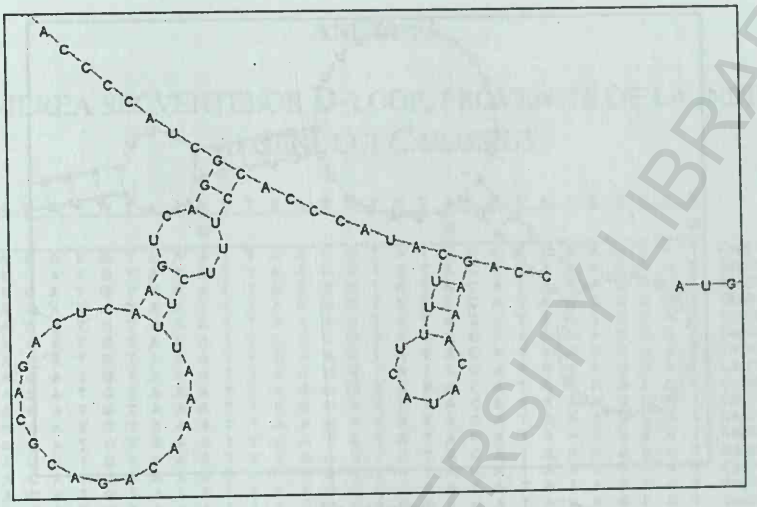


detaliul 7

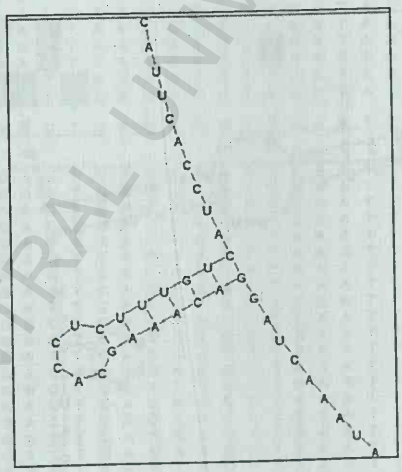


detaliul 8

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

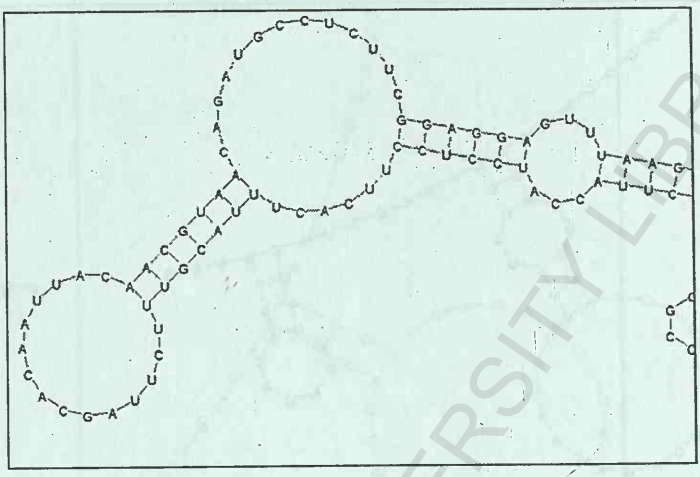


detaliul 9

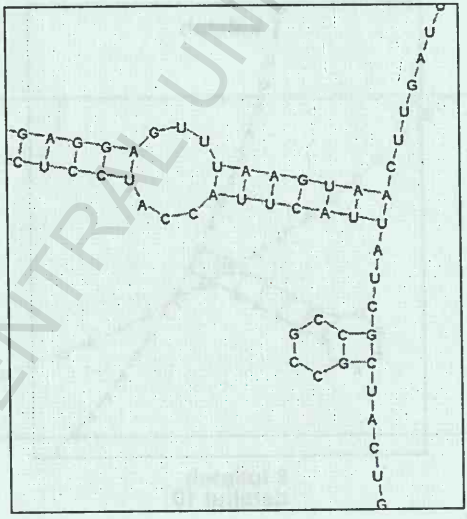


detaliul 10

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY



detaliul 11

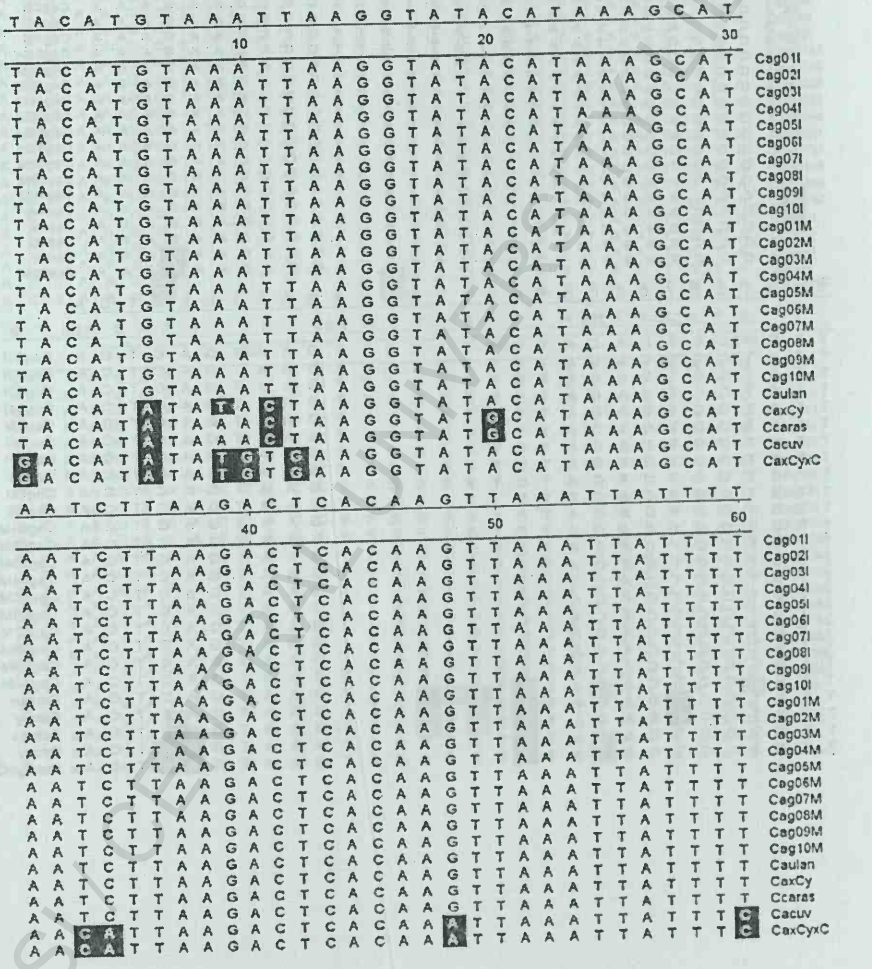


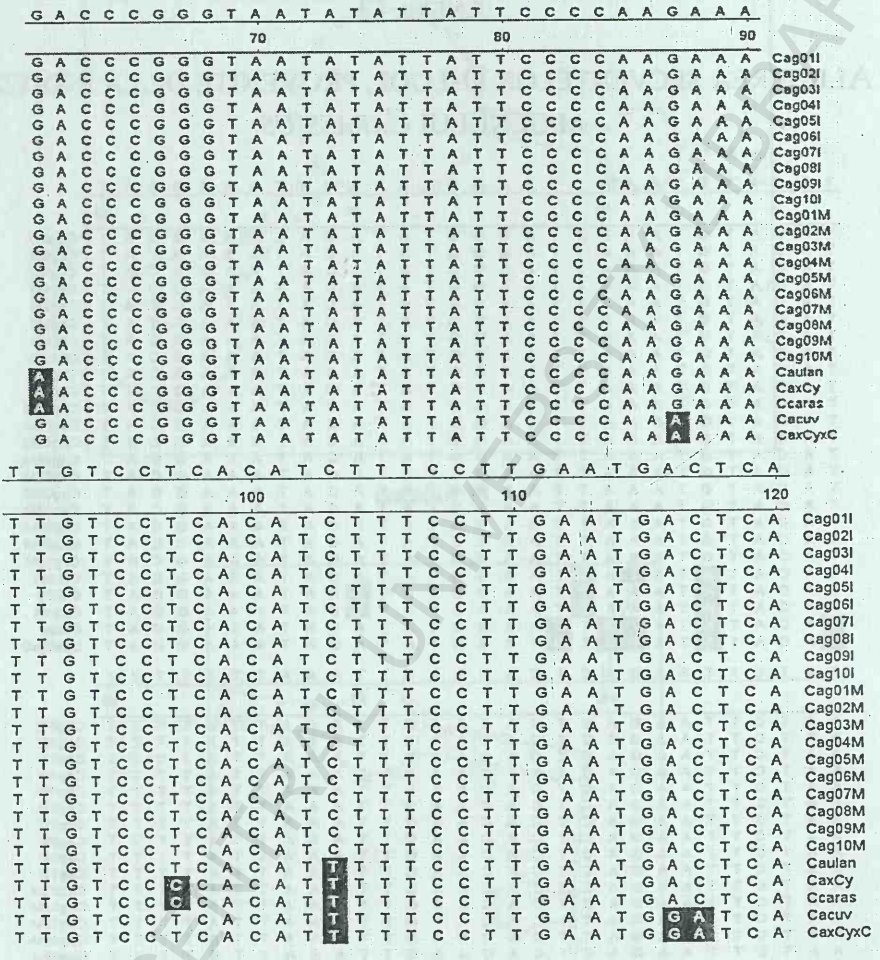
detaliul 12

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

ANEXA 12

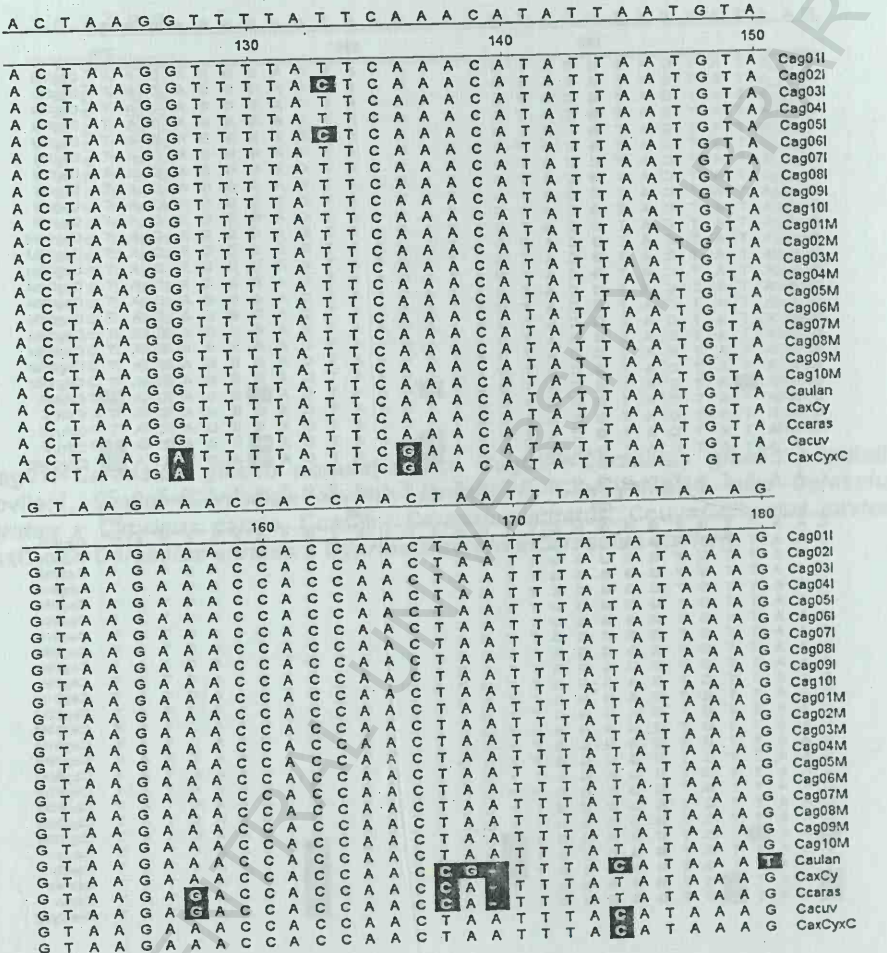
ALINIEREA SECVENȚELOR D-LOOP, PROVENITE DE LA INDIVIZI AI GENULUI *CARASSIUS*





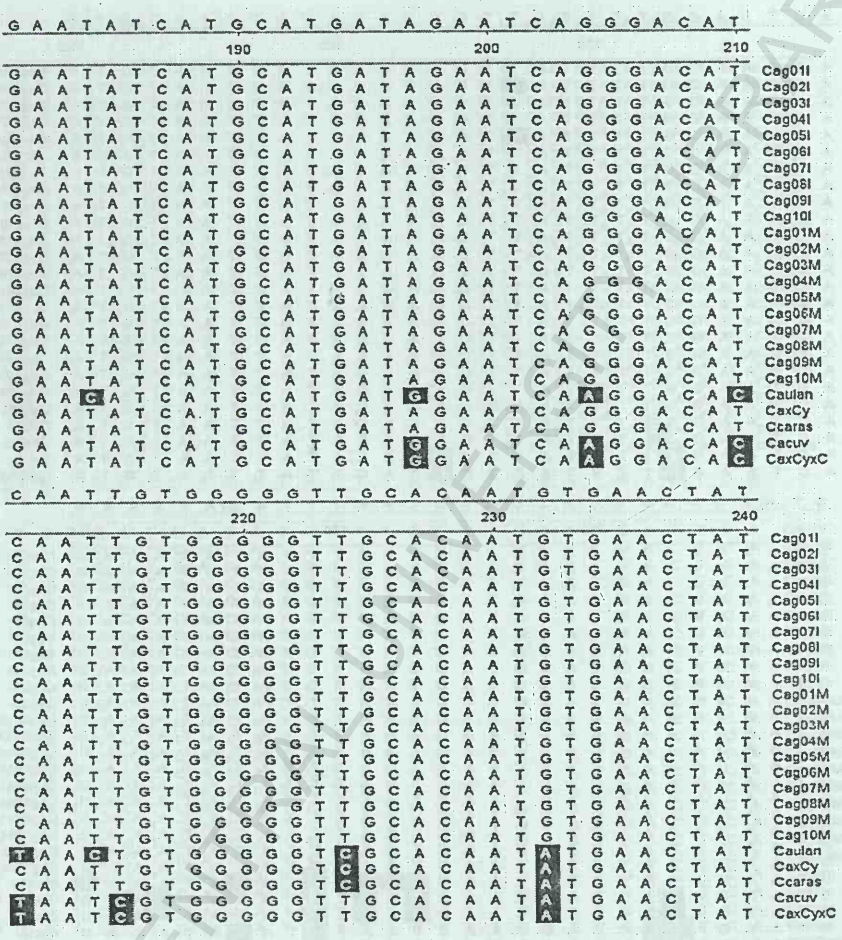
```
G A C C C G G G T A A T A T A T T A T T C C C C A A G A A A
                    70                  80                  90
G A C C C G G G T A A T A T A T T A T T C C C C A A G A A A   Cag01I
G A C C C G G G T A A T A T A T T A T T C C C C A A G A A A   Cag02I
G A C C C G G G T A A T A T A T T A T T C C C C A A G A A A   Cag03I
G A C C C G G G T A A T A T A T T A T T C C C C A A G A A A   Cag04I
G A C C C G G G T A A T A T A T T A T T C C C C A A G A A A   Cag05I
G A C C C G G G T A A T A T A T T A T T C C C C A A G A A A   Cag06I
G A C C C G G G T A A T A T A T T A T T C C C C A A G A A A   Cag07I
G A C C C G G G T A A T A T A T T A T T C C C C A A G A A A   Cag08I
G A C C C G G G T A A T A T A T T A T T C C C C A A G A A A   Cag09I
G A C C C G G G T A A T A T A T T A T T C C C C A A G A A A   Cag10I
G A C C C G G G T A A T A T A T T A T T C C C C A A G A A A   Cag01M
G A C C C G G G T A A T A T A T T A T T C C C C A A G A A A   Cag02M
G A C C C G G G T A A T A T A T T A T T C C C C A A G A A A   Cag03M
G A C C C G G G T A A T A T A T T A T T C C C C A A G A A A   Cag04M
G A C C C G G G T A A T A T A T T A T T C C C C A A G A A A   Cag05M
G A C C C G G G T A A T A T A T T A T T C C C C A A G A A A   Cag06M
G A C C C G G G T A A T A T A T T A T T C C C C A A G A A A   Cag07M
G A C C C G G G T A A T A T A T T A T T C C C C A A G A A A   Cag08M
G A C C C G G G T A A T A T A T T A T T C C C C A A G A A A   Cag09M
G A C C C G G G T A A T A T A T T A T T C C C C A A G A A A   Cag10M
A A C C C G G G T A A T A T A T T A T T C C C C A A G A A A   Caulan
A A C C C G G G T A A T A T A T T A T T C C C C A A G A A A   CaxCy
A A C C C G G G T A A T A T A T T A T T C C C C A A G A A A   Ccaras
G A C C C G G G T A A T A T A T T A T T C C C C A A A A A A   Cacuv
G A C C C G G G T A A T A T A T T A T T C C C C A A A A A A   CaxCyxC

T T G T C C T C A C A T C T T T C C T T G A A T G A C T C A
                    100                 110                 120
T T G T C C T C A C A T C T T T C C T T G A A T G A C T C A   Cag01I
T T G T C C T C A C A T C T T T C C T T G A A T G A C T C A   Cag02I
T T G T C C T C A C A T C T T T C C T T G A A T G A C T C A   Cag03I
T T G T C C T C A C A T C T T T C C T T G A A T G A C T C A   Cag04I
T T G T C C T C A C A T C T T T C C T T G A A T G A C T C A   Cag05I
T T G T C C T C A C A T C T T T C C T T G A A T G A C T C A   Cag06I
T T G T C C T C A C A T C T T T C C T T G A A T G A C T C A   Cag07I
T T G T C C T C A C A T C T T T C C T T G A A T G A C T C A   Cag08I
T T G T C C T C A C A T C T T T C C T T G A A T G A C T C A   Cag09I
T T G T C C T C A C A T C T T T C C T T G A A T G A C T C A   Cag10I
T T G T C C T C A C A T C T T T C C T T G A A T G A C T C A   Cag01M
T T G T C C T C A C A T C T T T C C T T G A A T G A C T C A   Cag02M
T T G T C C T C A C A T C T T T C C T T G A A T G A C T C A   Cag03M
T T G T C C T C A C A T C T T T C C T T G A A T G A C T C A   Cag04M
T T G T C C T C A C A T C T T T C C T T G A A T G A C T C A   Cag05M
T T G T C C T C A C A T C T T T C C T T G A A T G A C T C A   Cag06M
T T G T C C T C A C A T C T T T C C T T G A A T G A C T C A   Cag07M
T T G T C C T C A C A T C T T T C C T T G A A T G A C T C A   Cag08M
T T G T C C T C A C A T C T T T C C T T G A A T G A C T C A   Cag09M
T T G T C C T C A C A T C T T T C C T T G A A T G A C T C A   Cag10M
T T G T C C T C A C A T T T T T C C T T G A A T G A C T C A   Caulan
T T G T C C C C A C A T T T T T C C T T G A A T G A C T C A   CaxCy
T T G T C C C C A C A T T T T T C C T T G A A T G A C T C A   Ccaras
T T G T C C T C A C A T T T T T C C T T G A A T G G A T C A   Cacuv
T T G T C C T C A C A T T T T T C C T T G A A T G G A T C A   CaxCyxC
```

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

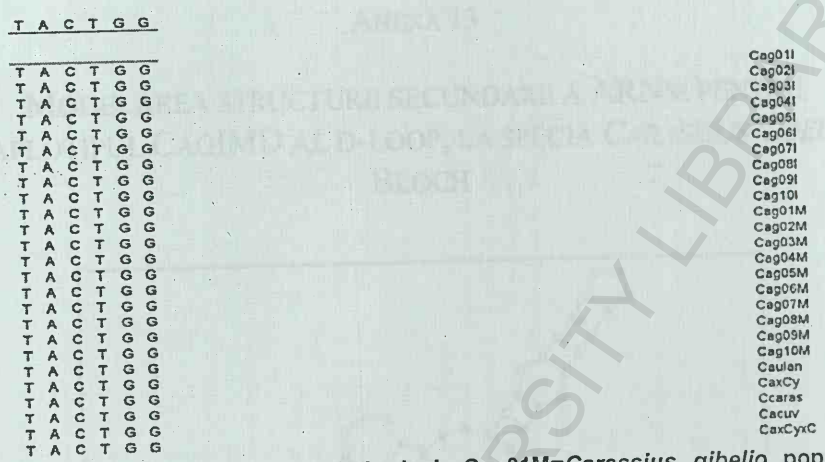


```
A C T A A G G T T T T A T T C A A A C A T A T T A A T G T A
                    130                     140                     150
A C T A A G G T T T T A T T C A A A C A T A T T A A T G T A   Cag01I
A C T A A G G T T T T A C T C A A A C A T A T T A A T G T A   Cag02I
A C T A A G G T T T T A T T C A A A C A T A T T A A T G T A   Cag03I
A C T A A G G T T T T A T T C A A A C A T A T T A A T G T A   Cag04I
A C T A A G G T T T T A C T C A A A C A T A T T A A T G T A   Cag05I
A C T A A G G T T T T A T T C A A A C A T A T T A A T G T A   Cag06I
A C T A A G G T T T T A T T C A A A C A T A T T A A T G T A   Cag07I
A C T A A G G T T T T A T T C A A A C A T A T T A A T G T A   Cag08I
A C T A A G G T T T T A T T C A A A C A T A T T A A T G T A   Cag09I
A C T A A G G T T T T A T T C A A A C A T A T T A A T G T A   Cag10I
A C T A A G G T T T T A T T C A A A C A T A T T A A T G T A   Cag01M
A C T A A G G T T T T A T T C A A A C A T A T T A A T G T A   Cag02M
A C T A A G G T T T T A T T C A A A C A T A T T A A T G T A   Cag03M
A C T A A G G T T T T A T T C A A A C A T A T T A A T G T A   Cag04M
A C T A A G G T T T T A T T C A A A C A T A T T A A T G T A   Cag05M
A C T A A G G T T T T A T T C A A A C A T A T T A A T G T A   Cag06M
A C T A A G G T T T T A T T C A A A C A T A T T A A T G T A   Cag07M
A C T A A G G T T T T A T T C A A A C A T A T T A A T G T A   Cag08M
A C T A A G G T T T T A T T C A A A C A T A T T A A T G T A   Cag09M
A C T A A G G T T T T A T T C A A A C A T A T T A A T G T A   Cag10M
A C T A A G G T T T T A T T C A A A C A T A T T A A T G T A   Caulan
A C T A A G G T T T T A T T C A A A C A T A T T A A T G T A   CaxCy
A C T A A G G T T T T A T T C A A A C A T A T T A A T G T A   Ccaras
A C T A A G A T T T T A T T C G A A C A T A T T A A T G T A   Cacuv
A C T A A G A T T T T A T T C G A A C A T A T T A A T G T A   CaxCyxC

G T A A G A A A C C A C C A A C T A A T T T A T A T A A A G
                    160                     170                     180
G T A A G A A A C C A C C A A C T A A T T T A T A T A A A G   Cag01I
G T A A G A A A C C A C C A A C T A A T T T A T A T A A A G   Cag02I
G T A A G A A A C C A C C A A C T A A T T T A T A T A A A G   Cag03I
G T A A G A A A C C A C C A A C T A A T T T A T A T A A A G   Cag04I
G T A A G A A A C C A C C A A C T A A T T T A T A T A A A G   Cag05I
G T A A G A A A C C A C C A A C T A A T T T A T A T A A A G   Cag06I
G T A A G A A A C C A C C A A C T A A T T T A T A T A A A G   Cag07I
G T A A G A A A C C A C C A A C T A A T T T A T A T A A A G   Cag08I
G T A A G A A A C C A C C A A C T A A T T T A T A T A A A G   Cag09I
G T A A G A A A C C A C C A A C T A A T T T A T A T A A A G   Cag10I
G T A A G A A A C C A C C A A C T A A T T T A T A T A A A G   Cag01M
G T A A G A A A C C A C C A A C T A A T T T A T A T A A A G   Cag02M
G T A A G A A A C C A C C A A C T A A T T T A T A T A A A G   Cag03M
G T A A G A A A C C A C C A A C T A A T T T A T A T A A A G   Cag04M
G T A A G A A A C C A C C A A C T A A T T T A T A T A A A G   Cag05M
G T A A G A A A C C A C C A A C T A A T T T A T A T A A A G   Cag06M
G T A A G A A A C C A C C A A C T A A T T T A T A T A A A G   Cag07M
G T A A G A A A C C A C C A A C T A A T T T A T A T A A A G   Cag08M
G T A A G A A A C C A C C A A C T A A T T T A T A T A A A G   Cag09M
G T A A G A A A C C A C C A A C T A A T T T A T A T A A A G   Cag10M
G T A A G A A A C C A C C A A C C G - T T T A C A T A A A T   Caulan
G T A A G A A A C C A C C A A C C A - T T T A T A T A A A G   CaxCy
G T A A G A G A C C A C C A A C C A - T T T A T A T A A A G   Ccaras
G T A A G A G A C C A C C A A C T A A T T T A C A T A A A G   Cacuv
G T A A G A A A C C A C C A A C T A A T T T A C A T A A A G   CaxCyxC
```

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY



BCU IASI / CENTRUL DE CARTE RARĂ

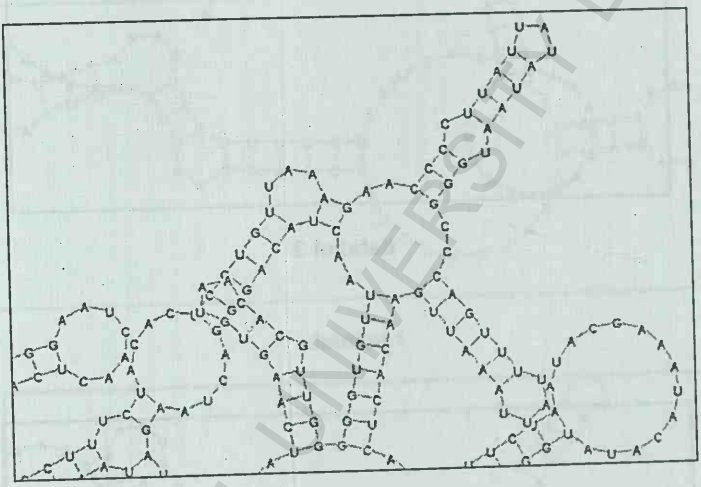


(Cag01I=*Carassius gibelio* populația Iași, Cag01M=*Carassius gibelio* populația Movileni, Caulan=*Carassius auratus langsdörfi*, CaxCy=hibrid între *Carassius auratus x Cyprinus carpio*, Ccaras= *Carassius auratus*, Ccuv=*Carassius cuvieri*, CaxCyxC=*Carassius auratus x Cyprinuis carpio x Carassius cuvieri*)

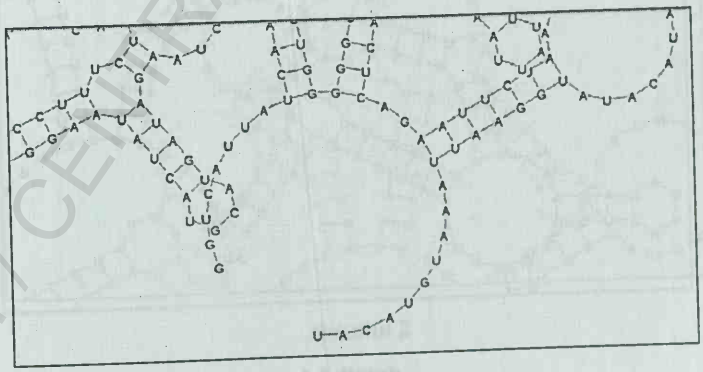
BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

ANEXA 13

MODELAREA STRUCTURII SECUNDARE A ARNM PENTRU HAPLOTIPUL CAGIMD AL D-LOOP, LA SPECIA *CARASSIUS GIBELIO* BLOCH

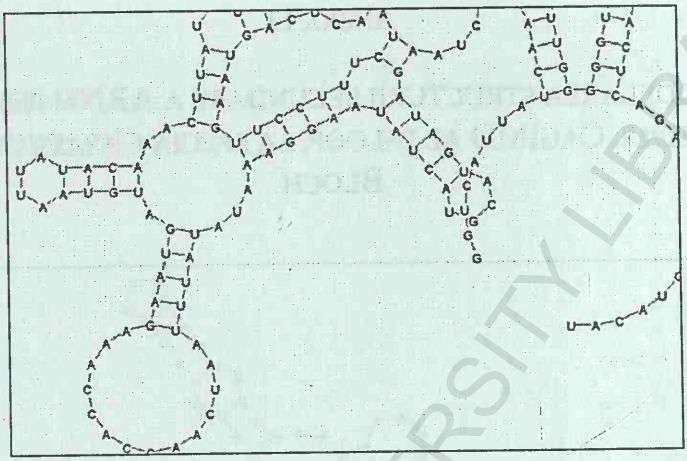


detaliul 1

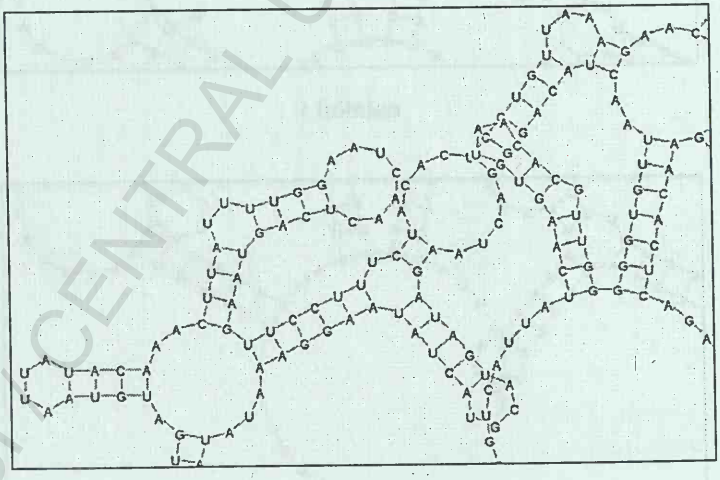


detaliul 2

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY



detaliul 3

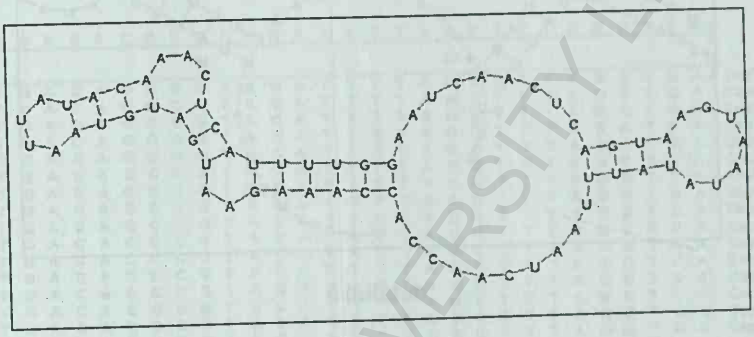


detaliul 4

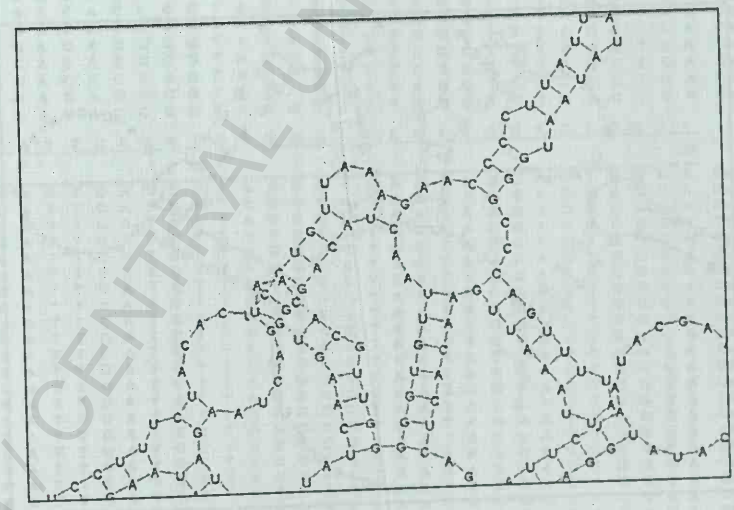
BCU IAȘI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

ANEXA 14

MODELAREA STRUCTURII SECUNDARE A ARNM PENTRU HAPLOTIPUL CAG25ID AL D-LOOP, LA SPECIA *CARASSIUS GIBELIO* BLOCH

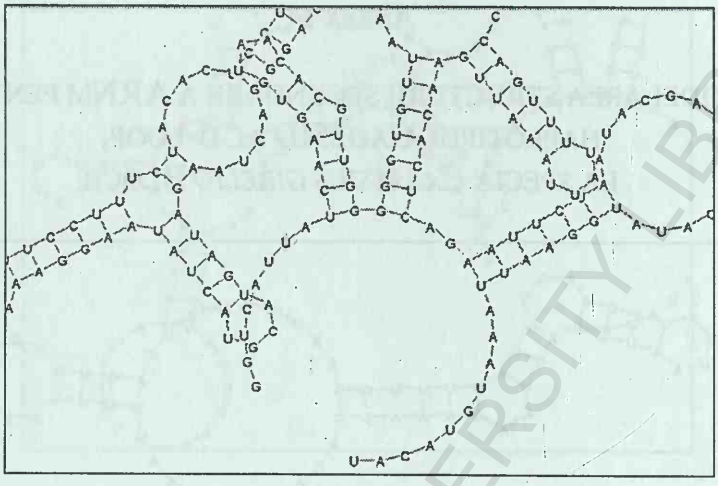


detaliul 1

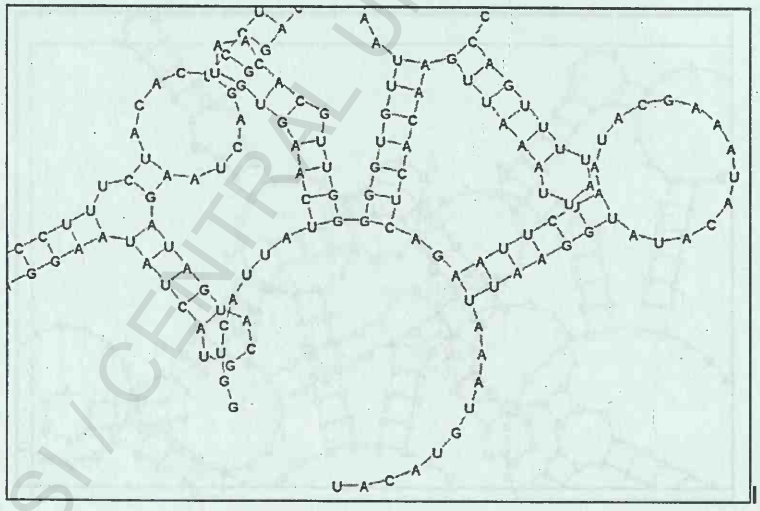


detaliul 2

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY



detaliul 3

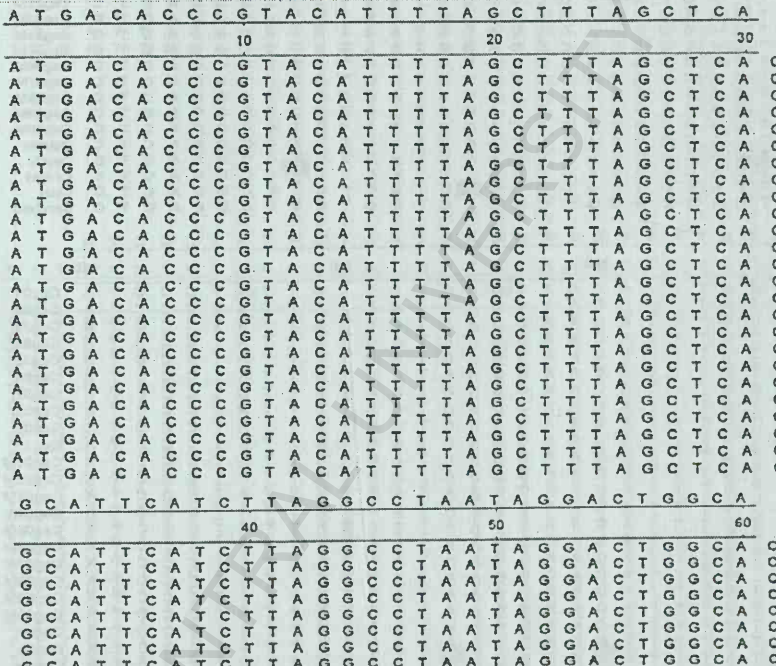


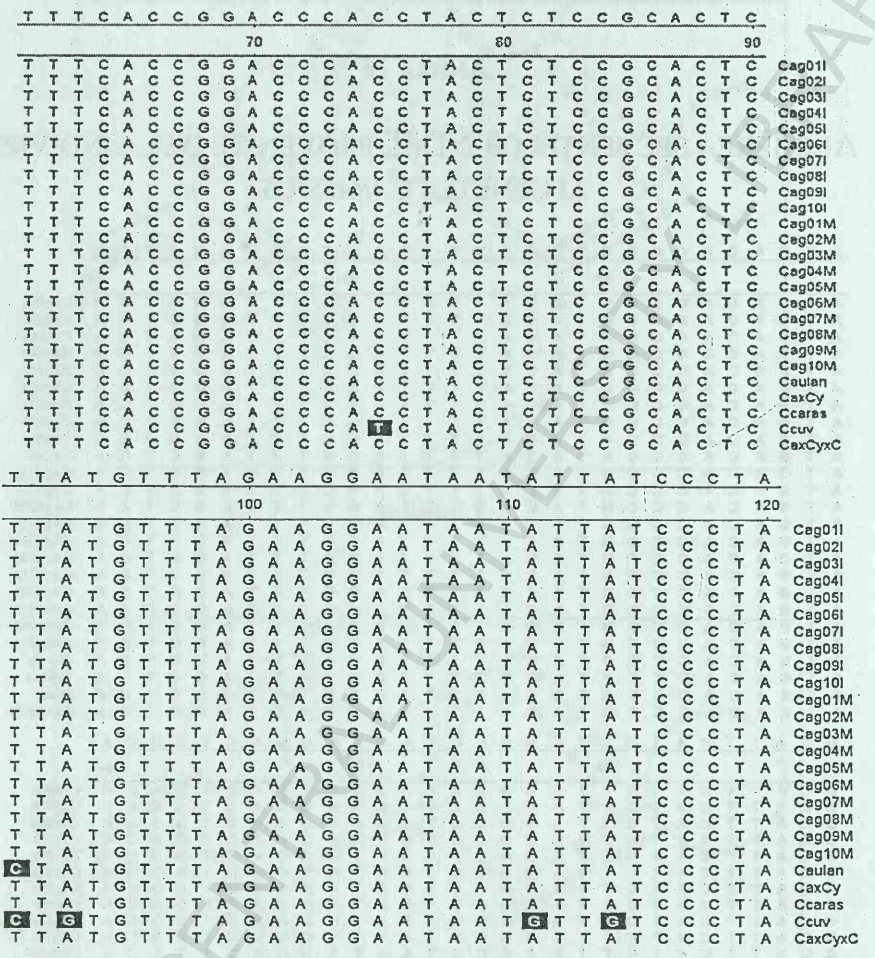
detaliul 4

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

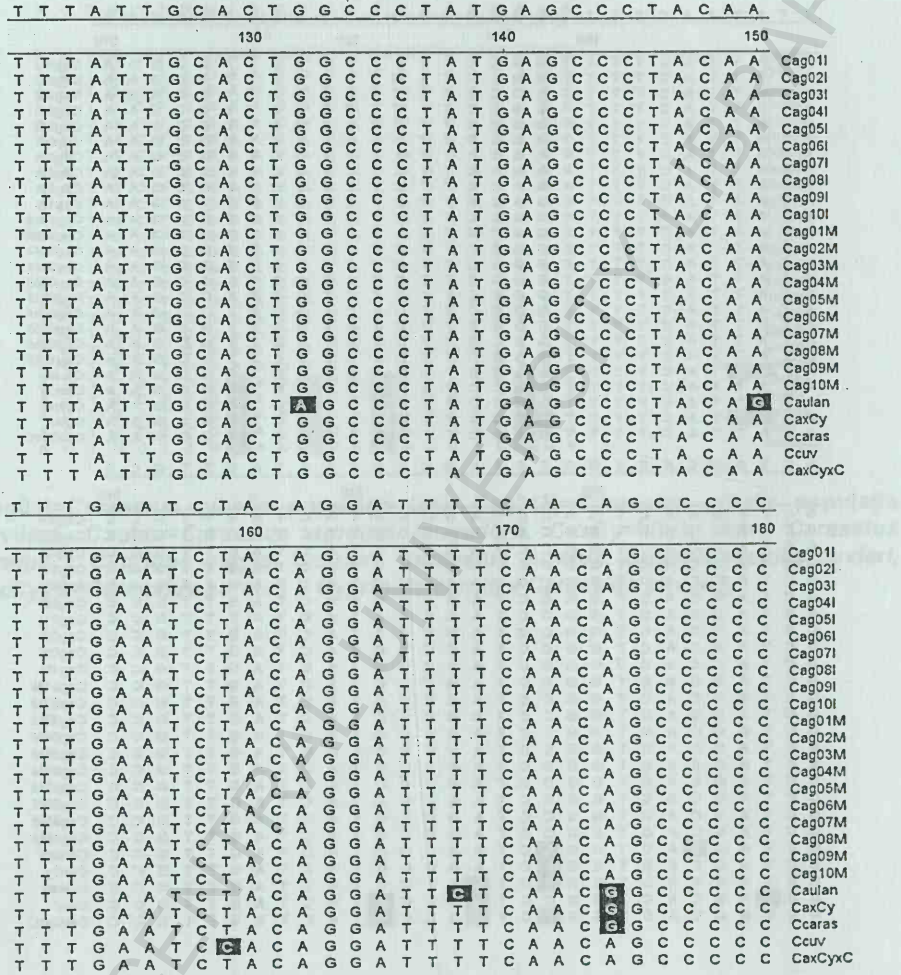
ANEXA 15

ALINIEREA SECVENȚELOR ND4L PROVENITE DE LA INDIVIZI AI GENULUI *CARASSIUS*



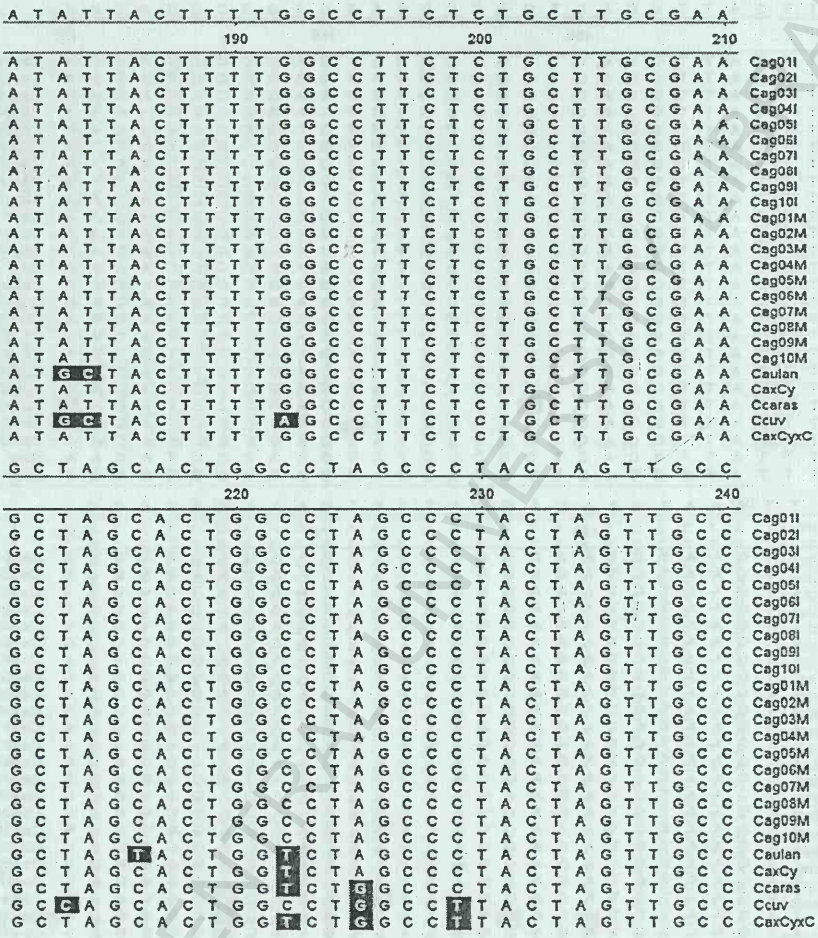


BCU IASI / CENTRUL DE RESURSE PENTRU BIBLIOTECARI

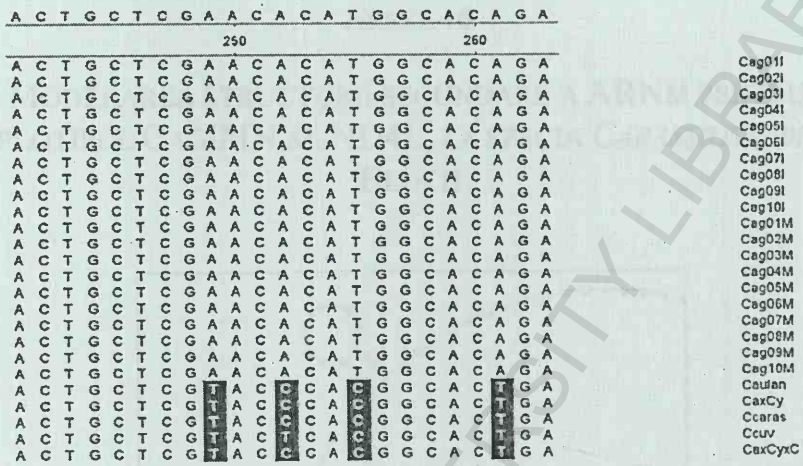


```
T T T A T T G C A C T G G C C C T A T G A G C C C T A C A A
                    130                 140                 150
T T T A T T G C A C T G G C C C T A T G A G C C C T A C A A  Cag01I
T T T A T T G C A C T G G C C C T A T G A G C C C T A C A A  Cag02I
T T T A T T G C A C T G G C C C T A T G A G C C C T A C A A  Cag03I
T T T A T T G C A C T G G C C C T A T G A G C C C T A C A A  Cag04I
T T T A T T G C A C T G G C C C T A T G A G C C C T A C A A  Cag05I
T T T A T T G C A C T G G C C C T A T G A G C C C T A C A A  Cag06I
T T T A T T G C A C T G G C C C T A T G A G C C C T A C A A  Cag07I
T T T A T T G C A C T G G C C C T A T G A G C C C T A C A A  Cag08I
T T T A T T G C A C T G G C C C T A T G A G C C C T A C A A  Cag09I
T T T A T T G C A C T G G C C C T A T G A G C C C T A C A A  Cag10I
T T T A T T G C A C T G G C C C T A T G A G C C C T A C A A  Cag01M
T T T A T T G C A C T G G C C C T A T G A G C C C T A C A A  Cag02M
T T T A T T G C A C T G G C C C T A T G A G C C C T A C A A  Cag03M
T T T A T T G C A C T G G C C C T A T G A G C C C T A C A A  Cag04M
T T T A T T G C A C T G G C C C T A T G A G C C C T A C A A  Cag05M
T T T A T T G C A C T G G C C C T A T G A G C C C T A C A A  Cag06M
T T T A T T G C A C T G G C C C T A T G A G C C C T A C A A  Cag07M
T T T A T T G C A C T G G C C C T A T G A G C C C T A C A A  Cag08M
T T T A T T G C A C T G G C C C T A T G A G C C C T A C A A  Cag09M
T T T A T T G C A C T G G C C C T A T G A G C C C T A C A A  Cag10M
T T T A T T G C A C T A G C C C T A T G A G C C C T A C A G  Caulan
T T T A T T G C A C T G G C C C T A T G A G C C C T A C A A  CaxCy
T T T A T T G C A C T G G C C C T A T G A G C C C T A C A A  Ccaras
T T T A T T G C A C T G G C C C T A T G A G C C C T A C A A  Ccuv
T T T A T T G C A C T G G C C C T A T G A G C C C T A C A A  CaxCyxC

T T T G A A T C T A C A G G A T T T T C A A C A G C C C C C
                    160                 170                 180
T T T G A A T C T A C A G G A T T T T C A A C A G C C C C C  Cag01I
T T T G A A T C T A C A G G A T T T T C A A C A G C C C C C  Cag02I
T T T G A A T C T A C A G G A T T T T C A A C A G C C C C C  Cag03I
T T T G A A T C T A C A G G A T T T T C A A C A G C C C C C  Cag04I
T T T G A A T C T A C A G G A T T T T C A A C A G C C C C C  Cag05I
T T T G A A T C T A C A G G A T T T T C A A C A G C C C C C  Cag06I
T T T G A A T C T A C A G G A T T T T C A A C A G C C C C C  Cag07I
T T T G A A T C T A C A G G A T T T T C A A C A G C C C C C  Cag08I
T T T G A A T C T A C A G G A T T T T C A A C A G C C C C C  Cag09I
T T T G A A T C T A C A G G A T T T T C A A C A G C C C C C  Cag10I
T T T G A A T C T A C A G G A T T T T C A A C A G C C C C C  Cag01M
T T T G A A T C T A C A G G A T T T T C A A C A G C C C C C  Cag02M
T T T G A A T C T A C A G G A T T T T C A A C A G C C C C C  Cag03M
T T T G A A T C T A C A G G A T T T T C A A C A G C C C C C  Cag04M
T T T G A A T C T A C A G G A T T T T C A A C A G C C C C C  Cag05M
T T T G A A T C T A C A G G A T T T T C A A C A G C C C C C  Cag06M
T T T G A A T C T A C A G G A T T T T C A A C A G C C C C C  Cag07M
T T T G A A T C T A C A G G A T T T T C A A C A G C C C C C  Cag08M
T T T G A A T C T A C A G G A T T T T C A A C A G C C C C C  Cag09M
T T T G A A T C T A C A G G A T T T T C A A C A G C C C C C  Cag10M
T T T G A A T C T A C A G G A T T C T C A A C G G C C C C C  Caulan
T T T G A A T C T A C A G G A T T T T C A A C G G C C C C C  CaxCy
T T T G A A T C T A C A G G A T T T T C A A C G G C C C C C  Ccaras
T T T G A A T C C A C A G G A T T T T C A A C A G C C C C C  Ccuv
T T T G A A T C T A C A G G A T T T T C A A C A G C C C C C  CaxCyxC
```

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY



BCU IASI / CENTRUL DE DOCUMENTARE

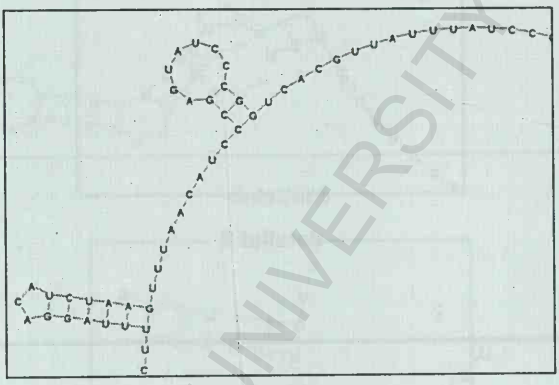


(Cag01I=*Carassius gibelio* populația Iași, Cag01M=*Carassius gibelio* populația Movileni, Caulan=*Carassius auratus langsdörfi*, CaxCy=hibrid între *Carassius auratus x Cyprinus carpio*, Ccaras= *Carassius auratus*, Ccuv=*Carassius cuvieri*, CaxCyxC=*Carassius auratus x Cyprinuis carpio x Carassius cuvieri*)

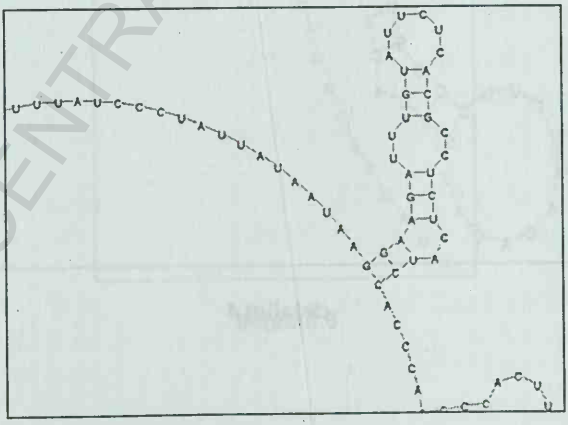
BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

ANEXA 16

MODELAREA STRUCTURII SECUNDARE A ARNM PENTRU HAPLOTIPUL CAGIMN AL ND4L, LA SPECIA *CARASSIUS GIBELIO* BLOCH

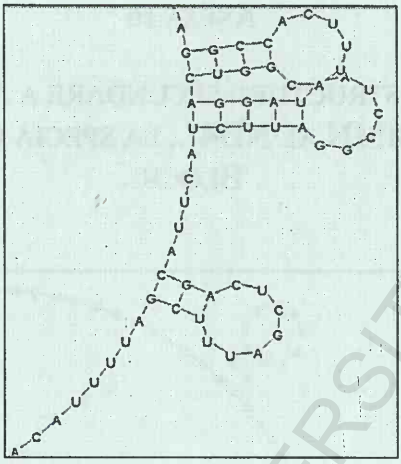


detaliul 1

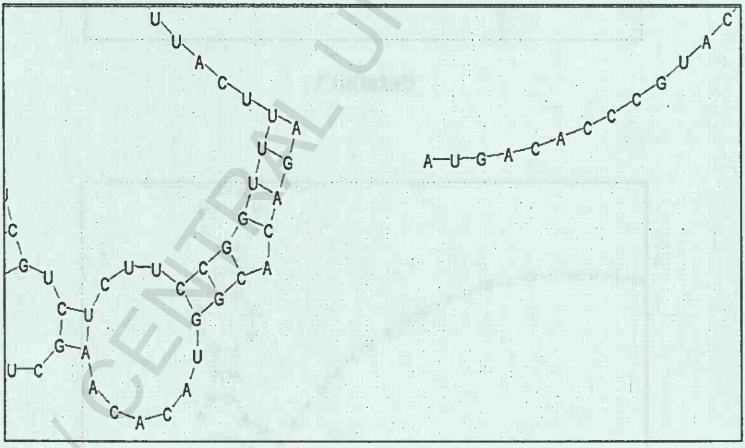


detaliul 2

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

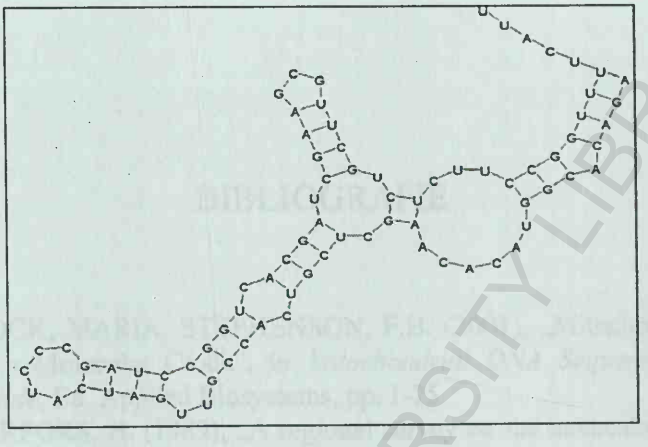


detaliul 3

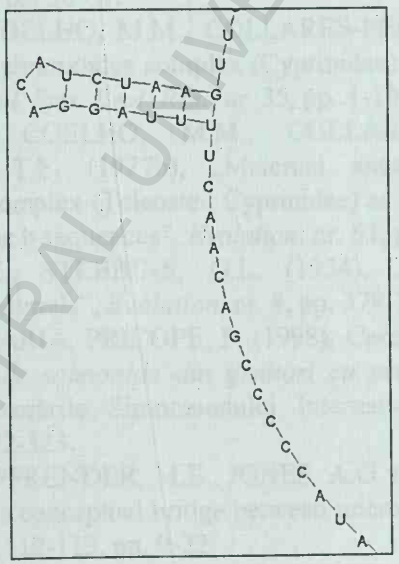


detaliul 4

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY



detaliul 5



detaliul 6

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

BIBLIOGRAFIE

1. ABILOCK, MARIA, STEPHENSON, F.H. (2001), „Mitochondrial DNA as a Molecular Clock", în *Mitochondrial DNA Sequencing Student Guide*, Ed. Applied Biosystems, pp. 1-25.
2. ACKERFORS, H. (1989), „A regional survey on the acvaculture sector in eastern and northwestern Europe", *Aquacult. dev. and coord. progr. ADCP. REP.*, pp. 38-89.
3. ALVES, M.J., COELHO, M.M., COLLARES-PEREIRA, M.J. (1997a), „The Rutilus alburnoides complex (Cyprinidae): evidence for a hybrid origin", *J. Zool. Syst. Evol. Res.*, nr. 35, pp. 1-10.
4. ALVES, M.J., COELHO, M.M., COLLARES-PEREIRA, M.J., DOWLING, T.E. (1977b), „Maternal ancestry of the Rutilus alburnoides complex (Teleostei, Cyprinidae) as determined by analysis oh cytochrome b sequences", *Evolution*, nr. 51, pp. 1584-1592.
5. ANDERSON, E., STEBBINS, G.L. (1954), „Hybridization as an evolutionary stimuls", *Evolution*, nr. 8, pp. 378-388.
6. APETROAEI, MARIA, PRICOPE, F. (1998), *Cercetări privind obținerea unor hibrizi de salmonide din genitori cu perioade de reproducere diferite* – Lucrările Simpozionului Internațional AQUAROM '98 Galați, pp. 322-323.
7. ARNOLD, S.J., PFRENDER, M.E., JONES, A.G. (2001), „The adaptative landscape as a conceptual bridge between micro- and macroevolution", *Genetica*, nr. 112-113, pp. 9-32.
8. ATCHLEY, W.R., FITCH, W.M., BRONNER-FRASER, M. (1994), „Molecular evolution of the MyoD family of transcription factors", *Proc. Natl. Acad Sci. USA*, nr. 91, pp. 11522-11526.
9. ATTESON, K. (1999), „The performance of the neighbor-joining methods of phylogeneticreconstruction", *Algorithmica*, nr. 25, pp. 251-278.
10. AUSUBEL, F.M., BRENT, R., KINGSTON, R.E., MOORE, D.D., SEIDMAN, J.G., SMITH, J.A., STRUHL, K. (1992), *Short protocols*

BCU UNIVERSITY LIBRARY

in molecular biology, 3rd Edition, cap. 2 – *Preparation and analysis of DNA*, Ed. by John Wiley & Sons, Inc., pp. 23-25.

11. AUSUBEL, F.M., BRENT, R., KINGSTON, R.E., MOORE, D.D., SEIDMAN, J.G., SMITH, J.A., STRUHL, K. (1995), *Current protocols in molecular biology*, vol. 1, cap. 2 – *Preparation and analysis of DNA. Phenol extraction and ethanol precipitation of DNA*, Ed by John Wiley & Sons, Inc., pp. 211-213.
12. BADER, D., MORET, B., YAN, M. (2001), „A linear-time algorithm for computing in- version distance between signed permutations with an experimental study", *J. Comput. Biol.*, nr. 8 (5), pp. 483-491.
13. BAFNA, V., PEVZNER, P. (1995), „Sorting permutations by transpositions", *Proc. 6th Ann. ACM/SIAM Symp. Discrete Algs* (SODA'95), SIAM Press, Philadelphia, pp. 614-623.
14. BARNDORFF-NIELSEN, O. (1983), „On a formula for the distribution of the maximum likelihood estimator", *Biometrika*, nr. 70, pp. 343-365.
15. BĂNĂRESCU, P. (1964), *Fauna Republicii Populare Române – Pisces-Osteichthyes (Peşti ganoizi şi osoşi)*, vol. XIII, Editura Academiei R.P.R., Bucureşti, pp. 297-503.
16. BĂNĂRESCU, P. (1973), „Some reconsiderations on the zoogeography of the Euro-mediterranean freshwater fish fauna", *Rev. Roum. Biol. Zool.*, nr. 18, pp. 257-264.
17. BĂNĂRESCU, P. (1975), *Orientări moderne în taxonomia şi sistematica animală. Probleme actuale de biologie I*, Editura Didactică şi Pedagogică, Bucureşti, pp. 5-20.
18. BĂNĂRESCU, P. (1989), „Zoogeography and history of the freshwater fish fauna of Europe", în: J. Holeik (ed.), *The freshwater fishes of Europe*, Wiesbaden: AULA, vol. 1, pp. 88-107.
19. BĂNĂRESCU, P. (1992), *Zoogeography of fresh-waters*, vol. 2: *Distribution and dispersal of freshwater animals* in *North America and Eurasia*, AULA,Wiesbaden, pp. 519-1091.
20. BĂNĂRESCU, P., COAD, B.W. (1991), „Cyprinids of Eurasia În Cyprinid fishes Systematics, biology and exploitation", în: I.J. Winfield, J.S. Nelson (Eds.), Chapman & Hall, London, pp. 127-155.
21. BĂRA, I.I. (1996), *Vademecum în genetică*, Editura Corson, Iaşi, pp.136-138.
22. BEERLI, P., FELSENSTEIN, J. (1999), „Maximum-likelihood estimation of migration rates and effective population numbers in two populations using a coalescent approach", *Genetics*, nr. 152, pp. 763-773.

23. BENDER, M., GE, D., HE, S., HU, H., PINTER, R., SKIENA, S., SWIDAN, F. (2004), „Improved bounds on sorting with length-weighted reversals", *Proc. 15th Ann. ACM/SIAM Symp. Discrete Algs.* (SODA'04), SIAM Press, Philadelphia, pp. 912-921.
24. BENSCH, S., HASSELQUIST, D. (1999), „Phylogeographic population structure of great reed warblers: an analysis of mtDNA control region sequences", *Biol. Jour. Linn. Soc.*, nr. 66, pp. 171-185.
25. BERNATCHEZ, L. (2001), „The evolutionary history of brown trout (*Salmo trutta* L.) inferred from phylogeographic, nested clade, and mismatch analyses of mitochondrial DNA variation", *Evolution*, nr. 55 (2), pp. 351-379.
26. BERREBI, P. (1995), „Speciation of the genus Barbus in the north mediterranean basin: recent advances from biochemical genetics", *Biol. Conserv.*, nr. 72, pp. 237-249.
27. BERREBI, P., KOTTELAT, M., SKELTON, P., RAB, P. (1996), „Systematics of barbus: state of the art and heuristic comments", *Folia Zool.*, nr. 45, pp. 5-12.
28. BERREBI, P., KRAIEM, M.M., DOADRIO, I., EL-GHARBI, S., CATTANEO-BERREBI, G. (1995), „Ecological and genetic differentiation of Barbus callensis populations (*Teleostei*, *Cyprinidae*) in Tunisia", *J. Fish. Biol.*, nr. 47, pp. 850-864.
29. BIDWELL, C.A., CHRISMAN, C.L., LIBEZ, G.S. (1985), *Aquaculture*, nr. 51 (1), pp. 25-33.
30. BILLARD, R. (1980), *L`étang et l`agriculture des eaux*, I.N.R.A. Publ., Paris, pag. 15-28.
31. BIRKY, W.C. (2001), „The inheritance of genes in mitochondria and chloroplasts: Laws, Mechanisms and models", *Annu. Rev. Genet.*, nr. 35, pp. 125-148.
32. BLOOMER, P., IMPSON, N.D. (2000), „Mitochondrial DNA differentiation in the critically endangered berg river redfin", *Journal of Heredity*, nr. 91, pp. 122-127.
33. BOESIGER, E. (1970), „L'hybridation facteur de l'évolution", *Science, Progrès, Découverte*, nr. 3426, pp. 30-35.
34. BOGOESCU, C., DABIJA, A., SANIELEVICI, E. (1980), *Atlas zoologic*, Editura Didactică şi Pedagogică, Bucureşti, pp. 112-137.
35. BONGERS, A.B.J., VELD, E.P.C., ABO-HASHEMA, K., BREMMER, I.M., EDING, E.H., KOMEN, J., RICHTER, C.J.J. (1994), „Androgenesis in common carp (*Cyprinus carpio* L.) using UV

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

irradiation in a synthetic ovarian fluid and heat shocks", *Aquaculture*, 122, pp. 119-133.

36. BOORE, J., COLLINS, T., STANTON, D., DAEHLER, L., BROWN, W. (1995), „Deducing the pattern of arthropod phylogeny from mitochondrial DNA rearrangements", *Nature*, nr. 376, pp. 163-165.
37. BOORE, J., BROWN, W. (1998), „Big trees from little genomes: Mitochondrial gene orderas a phylogenetic tool", *Current Opinion in Genet and Development*, nr. 8 (6), pp. 668-674.
38. BOTEZ, SANDA (1967), *Ce sunt hibrizii?*, Editura Ştiinţifică, Bucureşti pp. 32-66.
39. BOURQUE, G., PEVZNER, P. (2002) „Genome-scale evolution: reconstructing gene orders in the ancestral species", *Genome Research*, nr. 12, pp. 26-36.
40. BRAWLEY, SUSAN (1999), „Submission and retrieval of an aligned set of nucleic acid sequences", *J. Phycol.*, nr. 35, pp. 433-437.
41. BRUNO, W.J. (2000), „Weighted Neighbor-Joining: A Fast Approximation to Maximum-Likelihood Phylogeny Reconstruction", *Mol. Biol. Evol.*, nr. 17 (1), pp. 189-197.
42. BRUNO, W.J., SOCCI, N.D., HALPERN, A.L. (2000), „Weighted neighbor-joining: A likelihood-based approach to distance-based phylogeny reconstruction", *Mol. Biol. Evol.*, nr. 17 (1), pp. 189-197.
43. BRYANT, D. (2000), „The complexity of calculating exemplar distances", în: D. Sanko, J. Nadeau (Eds.), *Comparative Genomics: Empirical and Analytical Approaches to Gene Order Dynamics, Map Alignment, and the Evolution of Gene Families*, Kluwer Academic Pubs., Dordrecht, Netherlands, pp. 207-212.
44. BRYANT, D., WADDELL, P. (1998), „Rapid evaluation of least-squares and minimum-evolution criteria on phylogenetic trees", *Mol. Biol. Evol.*, nr. 15 (10), pp. 1346-1359.
45. BUŞNIŢĂ, TH. (1971), *Atlasul peştilor din apele R.S.R. România*, Editura Ceres, Bucureşti, pp. 7-50.
46. CARAIMAN, GH. (1982), „Creşterea intensivă a puilor de crap (*Cyprinus carpio*) în condiţiile eutrofizării dirijate a heleşteielor în anul 1981", *Bulet. de cercetări piscicole*, Anul IV (XXXV), Nucet – Dîmboviţa, nr. 1-2, pp. 35-36.
47. CARBONARI, M, SBARIGIA, D, CIBATI, M, FIORILLI, M. (1993), „Optimization of PCR performance", Department of Clinical

BCU CLUJ / UNIVERSITY LIBRARY

Immunology, University of Rome La Sapienza, Italy, *Trends Genet.*, nr. 9 (2), pp. 42-43.

48. CARMONA, J.A., SANJUR, O., DOADRIO, I., MACHORDOM, A., VRIJENHOEK, R. (1997), „Hybridojenetic reproduction and maternal ancestry of polyploid european fish: the Tropidophoxinellus alburnoides complex", *Genetics*, nr. 146, pp. 983-993.
49. CASTRESANA, J. (2000), „Selection of conserved blocks form multiple Alignments for their use in phylogenetic analysis", *Mol. Biol. Evol.*, nr. 17 (4), pp. 540-552.
50. CAVALI-SFORZA, L.L., EDWARDS, A.W.F. (1964), „Analysis of human evolution", *Proc. 11th Intl. Cong. Genet.*, Pergamon, New York, pp. 923-933.
51. CAVALI-SFORZA, L.L., EDWARDS, A.W.F. (1967), „Phylogenetic analysis: Models and estimation procedures", *Am. J. Hum. Genet.*, nr. 19, pp. 233-257.
52. CAVENDER, T., COBURN, M. (1992), „Phylogenetic relationships of North American Cyprinidae", în: R. Mayden (Ed.), *Systematics, historical ecology, andNorth American freshwater fishes*, Stanford University Press, pp. 293-327.
53. CHANDRASEKHARAN, U.M., SANKER, S., GLYNIAS, M.J., KARNIK, S.S., HUSAIN, A. (1996), „Angiotensisn II-forming activity in a reconstructed ancestral chymase", *Science*, nr. 271, pp. 502-505.
54. CHANG, Y.S., HUANG, F.L., LO, T.B. (1994), „The complete nucleotide sequence and gene organization of carp (*Cyprinus carpio*) mitochondrial genome, *J. Mol. Evol.*, nr. 38, pp. 138-155.
55. CHARLESWORTH, D., (1981), „The cost of meiosis with alternation of sexual and asexual gEnerations", *J. Theor. Biol.*, nr. 87, pp. 517-528.
56. CHAUDHURI, P., DAS, S. (2002), „Swords: a statistical tool for analysing large DNA sequences", *J. Biosci.*, vol. 27, nr. 1, pp. 1-6.
57. CHEN, X.L., YUE, P.Q., LIN, R.D. (1984), „Major groups within the family Cyprinidae and their phylogenetic relationships", *Acta Zootaxon. Sin.*, nr. 9, pp. 424-440.
58. CHEN, S.J., DILL, K.A. (2000), „RNA folding energy landscapes", *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, nr. 2, pp. 646-651.
59. CHERFAS, N.B. (1975), „Investigation of radiation-induced diploid gynogenesys in the carp *Cyprinus carpio* L.. Experiments on obtaining the diploid gynogenetic progeny in mass quantities", *Genetika*, nr. 11 (7), pp. 78-86.

BCU MEDICINA UNIVERSITY LIBRARY

60. CHERFAS, N.B., GOMELSKY, B.I., EMELYANOVA, O.V., RECOUBRATSKY, A.V. (1994), „Induced diploid gynogenesis and polyploidy in crucian carp Carassius auratus gibelio (Block) x common carp *Cyprinus carpio* L. Hybrids", *Aquaculture Research Issue*, vol. 25 nr. 9; pp. 943-955.
61. CHERFAS, N.B., HULATA, G., GOMELSKY, B.I., BEN-DOM, N., PERETZ, Y. (1995), „Chromosome set manipulation in the common carp (*Cyprinus carpio*)", *Aquaculture*, nr. 129 (1-4), pp. 271-281.
62. CHERFAS, N.B., HULATA, G., KOZINSKY, O. (1993), „Gynogenesis in common carp IV Growth, phenotypic variation and gonad differentiation in normal and methyltestosterone – treated homozygous clones and F1 hybrids. 2. Timing of heat shock during the first cleavage", *Aquaculture*, nr. 111 (1-4); pp. 271-281.
63. CHOU, P.Y., FASMAN, G.D. (1978), „Prediction of the secondary structure of proteins from their amino acid sequence", *Adv. Enzymol.*, nr. 47, pp. 45-148.
64. CHOURROUT, D., CHVASSNE, B., GYYOMARD, R. (1986), „L'amelioration genetique des poissons", *La recherche* nr. 180, vol. 17, pp. 1028-1038.
65. CLAYTON, D.A. (1982), „Replication of animal mitochondrial DNA", *Cell*, nr. 28, pp. 693-705.
66. COCOLIN, L., D'AGARO, E., MANZANO, M., LANARI, D., COMI, G. (2000), „Rapid PCR-RFLP method for the identification of marine fish fillets", *Journal of Food Science*, vol 65, nr. 8, pp. 1315-1317.
67. COELHO, M.M. (1992), „Genetic differentiation in the Iberian Cyprinids *Chondrostoma polylepis* Steinchdaner, 1885 and *Ch. willkommii* Steinchdaner, 1866", *Arch. Hydrobiol.*, nr. 125, pp. 487-498.
68. COELHO, M.M., BRITO, R.M., PACHECO, T.R., FIGUEIREDO, D., PIRES, A.M. (1995), „Genetic variation and divergence of *L. pyrenaicus* and *L. caroliterlii* (*Pisces*, *Cyprinidae*)", *J. Fish Biol.*, nr. 47, pp. 243-258.
69. COSNER, M., JANSEN, R., MORET, B., RAUBESON, L., WANG, L., WARNOW, T., WYMAN, S. (2000), „A new fast heuristic for computing the breakpoint phylogeny and experimental phylogenetic analyses of real and synthetic data", *Proc. 8th International Conf. on Intelligent Systems for Mol. Biol.*, pp. 104-115.
70. CRISTEA, M. (1991), *Genetica ecologică şi evoluţia*, Editura Ceres, Bucureşti, pp. 24-36.

BCU IASI CENTRALA UNIVERSITARA

71. DANZMANN, R.G., GHARBI, K. (2001), „Gene mapping in fishes: a means to an end", *Genetics*, nr. 111, pp. 3-23.
72. DAY, W. (1983), „Computationally difficult parsimony problems in phylogenetic systematics", *Journal of Theoretical Biology*, nr. 103, pp. 429-438.
73. DAYHOFF, M.O., SCHWARTZ, R.M., ORCUTT, B.C. (1978), „A model of evolutionary change in proteins", în: M.O. Dayhoff (ed.), *Atlas of protein sequence and structure*, National Biomedical Research Foundation , Silver Spring, MD., pp. 345-352.
74. DESPER, R., GASCUEL, O. (2004), „Theoretical Foundation of the Balanced Minimum Evolution Method of Phylogenetic Inference and Its Relationship to Weighted Least-Squares Tree Fitting", *Mol. Biol. Evol.*, vol. 21, nr. 3, pp. 587-598.
75. DILL, W. (1988), „The inland fisheries of Israel", *The Israeli gomn. of Aquac.*, Bamidgeh, nr. 403, pp. 75-104.
76. DOADRIO, I. (1990), „Phylogenetic relationships and classification of west palearctic species of the genus Barbus (*Osteichthyes*, *Cyprinidae*), *Aquat. Living Resour.*, nr. 3, pp. 265-282.
77. DOBZHANSKY, TH. (1970), *Genetics of the evolutionary process*, Columbia Univ. Press, New York, pp. 391-393.
78. DOBZHANSKY, TH., AYALA, F.J., STEBBINS, L.G., VALENTINE, J.W. (1977), *Evolution*, W.H. Freeman and Comp., San Francisco, pp. 72-75.
79. DOBZHANSKY, TH., BOESIGER, E. (1968), *Essais sur l'évolution*, Masson et Cie Editeurs, Paris, p. 61.
80. ECK, R.V., DAYHOFF, M.O. (1966), *Atlas of protein sequence and structure*, National Biomedical Research Foundation (abstract).
81. EDWARDS A.W.F., CAVALLI-SFORZA L.L. (1963), „The reconstruction of evolution" *Heredity*, nr. 18, p. 553.
82. EFRON, B. (1982a), „Maximum likelihood and decision theory", *Annals of Statistics*, nr. 10, pp. 340-356.
83. EFRON, B. (1982b), *The jackknife, the bootstrap and other resampling plans*, Society for Industrial and Applied Mathemathics, Philadelphia, PA., p. 38.
84. EFRON, B., TIBSHIRANI, R.J. (1993), *An introduction to the bootstrap*,. Ed. Chapman & Hall, New York, pp. 193-274.
85. EL-MABROUK, N. (2000), „Genome rearrangement by reversals and insertions-deletions of contiguous segments", *Proc. 11th Ann. Symp.*

BCU CLUJ BABEŞ-BOLYAI UNIVERSITY LIBRARY

Combin. Pattern Matching, Vol. 1848 of Lecture Notes in Computer Science, Springer Verlag, pp. 222-234.

86. EMINI, E.A., HUGHES, J., PERLOW, D., BOGER, J. (1985), „Induction of hepatitis A virus-neutralizing antibody by a virus-specific synthetic peptide", *J. Virology*, nr. 55, pp. 836-839.
87. FEIDER, Z., GROSSU, V.AL., GYURKO, ŞT., POP, V. (1964), *Zoologia vertebratelor*, Editura Didactică şi Pedagogică, Bucureşti, pp.182-253.
88. FELSENSTEIN, J. (1981a), „Evolutionary trees from DNA sequences: A maximum likeli-hood approach", *J. Mol. Evol.*, nr. 17, pp. 368-376.
89. FELSENSTEIN, J. (1981b), „Numerical methods for inferring evolutionary trees", *Quart. Rev. Biol.*, nr. 57, pp. 379-404.
90. FINK, S.V., FINK, W.L. (1996), „Interrelationships of Ostariophysan fishes", în: M.L.J. Stiassny, L.R. Parenti, G.D. Johnson (Eds.), *Interrelationships of fishes*, Academic Press, San Diego, CA, pp. 209-250.
91. FITCH, W.M. (1967), „Evidence suggesting a non-random character to nucleotide replacements in naturally occuring mutations", *J. Mol. Biol.*, nr. 26, pp. 499-507.
92. FITCH, W.M. (1971), „Toward defining the course of evolution: Minimum change for a specific tree topology", *Syst. Zool.*, nr. 20, pp. 406-416.
93. FITCH, W.M. (1977), „On the problem of discovering the most parsimonious tree", *American Naturalist*, nr. 111, pp. 223-257.
94. FOWLER, J., COHEN, L., JARVIS, P. (2000), *Practical statistics for field biology*, Second Edition, Ed. John Wiley & Sons Ltd., England, pp. 186-207.
95. FUJIKAWA, N., NAKAYAMA, I., ONOZATO, H. (1993), „Ultraviolet induced androgenesis in Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* (L.), and hybrid Nile × blue tilapia, *O. aureus* (Steindachner)", *Bull. Nat. Res. Inst. of Aquaculture*, nr. 22, pp. 11-21.
96. GALLUT, CYRIL (1998), „Codage de l'ordre des genes du genome mitochondrial animal en vue d'une analyse phylogenetique", *DEA Biodiversité*, pp. 1-35.
97. GARNIER, J., OSGUTHORPE, D.J., ROBSON, B. (1978), „Analysis of the accuracy and implications of simple method for predicting the secondary structure of globular proteins", *Jour. Mol. Biol.*, nr. 120, pp. 97-120.

BCU IAŞI CENTRUL UNIVERSITAR LIBRARY

98. GASCUEL, O. (1997), „BIONJ: An improved version of the NJ algorithm based on a simple model of sequence data", *Mol. Biol. Evol.*, nr. 14 (7), pp. 685-695.
99. GASCUEL, O. (2000), „On the Optimization Principle in Phylogenetic Analysis and the Minimum-Evolution Criterion", *Mol. Biol. Evol.*, vol. 17, nr. 3, pp. 401-405.
100. GERBER, ANNE, LOGGINS, R., KIMAR, S., DOWLING, T.E. (2001), „Does nonneutral evolution shepe observed patterns of DNA variation in Animal mitochondrial genomes?", *Annu. Rev. Genet.*, nr. 35, pp. 539-566.
101. GERVAI, J., MARIAN, T., KRASZNAI, Z., NAGY, A., CSANYI, V. (1980), „Occurence of aneuploidy in radiation gynogenesis of carp", *J. Fish. Biol.*, nr. 16 (4), 435-439.
102. GOLOVINSKAIA, K.A. (1968), „Genetics and selection of fish and artificial gynogenesis of the carp, *Cyprinus carpio*", în: T.V.R. Pillay (Ed.), *Proc. World Symposium on warm water Pond Fish Culture*, nr. 44, vol. 4, pp. 215-222.
103. GOJOBORI, T., LI, W.H, GRAUR, D. (1982), „Patterns of nucleotide substitution in pseudogenes and functional genes", *J. Mol. Evol.*, nr. 18, pp. 360-369.
104. GOMELSKY, B.I., CHERFAS, N.B., HULATA, G., PERETZ, Y., BEN, N. (1993), „Chromosome set manipulation in common carp *Cyprinus carpio*", *Aquaculture Symposium of the carp*, Budapest, Hungary, 6-9 sept. (abstract).
105. GOODWIN, R.L., BAUMANN, H., BERGER, F.G. (1996), „Patterns of divergence during evolution of α_1-proteinase inhibitors in mammals", *Mol Biol Evol.*, nr. 13, pp. 346-358.
106. GORGAN, D.L., APETROAEI, MARIA, BĂRA, I.I. (2000), „Variabilitatea fenotipică la specii ale genului *Salmo*", în *Genetică şi Evoluţionism*, vol. 4, pp. 99-110, Editura Corson, Iaşi.
107. GORGAN, D.L., BĂRA, I.I. (2002), „The content in total nucleic acid at *Cyprinus carpio* L. and *Carassius carassius* L. Species", *An. Şt. ale Univ. „Al.I. Cuza"*, secţiunea IIa, Genetică şi Biologie Moleculară, Tom III, pp. 62-65, Iaşi.
108. GORGAN, D.L., BĂRA, I.I. (2003), „The nucleic acid content at *Cyprinus carpio* L. and *Carassius auratus gibelio* Bloch.", *An. Şt. ale Univ. „Al.I. Cuza"*, Genetică şi Biologie Moleculară, Tom IV, pp. 119-123, Iaşi.

BCU IAŞI UNIVERSITY LIBRARY

109. GORGAN, D.L. (2004a), „Stabilirea secvenței nucleotidice a citocromului b la *Carassius auratus gibelio* Bloch.", *Acta Ihtyologica*, nr. 1, sub tipar.
110. GORGAN, D.L. (2004b), „Stabilirea secvenței nucleotidice a ND4L la *Carassius auratus gibelio* Bloch. şi *Cyprinus carpio* L.", *Studii şi cercetări*, Biologie, Serie nouă, vol. IX, Universitatea din Bacău, pp. 103-106.
111. GORGAN, D.L., CÎMPEANU, S.C., GHERASIM, SORINA RALUCA (2004c), „Comparative researches about total DNA quantity from three different organs from *Carassius auratus gibelio* Bloch and *Cyprinus carpio* L"., *The 33rd International Session of Scientific Communications of the Faculty of Animal Science*, pp. 28-31, Bucureşti.
112. GORGAN, D.L., SANJUAN, L.A., COMENSAÑA, S.A., BĂRA, I.I. (2004d), „The D-loop sequence determination from *Carassius auratus gibelio* Bloch. Species", *An. Şt. ale Univ. „Al.I. Cuza"*, Genetică şi Biologie Moleculară, Tom V, pp. 103-106, Iaşi.
113. GORGAN D.L., CÎMPEANU, MIRELA MIHAELA (2004e), „ND4L nucleotide sequence compare for different species of *Carassius* genera", *The 33rd International Session of Scientific Communications of the Faculty of Animal Science*, pp. 22-27.
114. GORGAN D.L., CÎMPEANU, S.C., OLTEANU, ZENOVIA (2005), „The total DNA quantification for three types of tissue from *Carassius auratus gibelio* Bloch", *An. Şt. ale Univ. „Al.I. Cuza"*, Genetică şi Biologie Moleculară, Tom VI, pp. 193-196, Iaşi.
115. GRANT, V. (1977), *Organismic evolution*, W.H. Freeman and Comp., San Francisco, p. 418.
116. GUINDON, S., GASCUEL, O. (2003), „PHYML: a simple, fast, and accurate algorithm to estimate large phylogenies by maximum likelihood", *Syst. Biol.*, nr. 52 (5), pp. 696-704.
117. GUSTAFSSON, J.P., STEBBINS, G.L., AYALA, F.J. (1986), *Genetics, Development and evolution*, Plenum Press, New York (abstract).
118. HALL, T.A. (1999), „BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/ NT", *Nucleic Acids Symp. Ser.*, nr. 41, pp. 95-98.
119. HARTIGAN, J.A. (1973), „Minimum evolution fits to a given tree", *Biometrics*, nr. 29, pp. 53-65.

BCU IAŞI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

120. HARTMAN, T. (2003), „A simpler 1.5-approximation algorithm for sorting by transpositions", *Proc. 14th Ann. Symp. Combin. Pattern Matching*, Vol. 2676 of Lecture Notes in Computer Science, Springer Verlag, pp. 156-169.
121. HARTMAN, T., SHARAN, R. (2004), „A 1.5-approximation algorithm for sorting by transpositions and transreversals", *Proc. 4th Internationall Workshop on Algorithms. in Bioinformatics*, Vol. 3240 of Lecture Notes in Computer Science. Springer Verlag, pp. 50-61.
122. HASEGAWA, M., KISHINO, H., YANO, T. (1985), „Dating of the human-ape splitting by a molecular clock of mitochondrial DNA", *J. Mol. Evol.*, nr. 22, pp. 160-174.
123. HEARD, S. (1996), „Patterns in phylogenetic tree balance with variable and evolvingspeciation rates", *Evol.*, nr. 50, pp. 2141-2148.
124. HENDY, M.D., PENNY, D. (1989), „A framework for the quantitative study of evolutionary trees", *Syst. Zool.*, nr. 38, pp. 297-309.
125. HICKERSON, M.J., ROSS, J.R.P. (2001), „Postglacial population history and genetic structure of the northern clingfish (*Gobbiesox maeandricus*), revealed from mtDNA analysis", *Marine Biology*, nr. 138, pp. 407-419.
126. HIGGINS, D.G., SHARP, P.M. (1989). „Fast and sensitive multiple sequence alignments on a microcomputer", *CABIOS*, Vol. 5, nr. 2:, pp. 151-153.
127. HIGGINS, D.G. (1994), „Clustal V: Multiple alignment of DNA and protein sequences", *Methods Mol. Biol.*, nr. 25, pp. 307-318.
128. HILLIS, D.M., LARSON, A., DAVIS, S.K., ZIMMER, ELIZABETH (1996), „Nucleic Acids III: Sequencing", *Molecular systematics*, 2nd ed., Sinauer Assoc., Sunderland MA, Chapter 9, pp. 318-370.
129. HOLLEBECQ, M.G., CHOURROUT, D., WOHLFARTH, G., BILLARD, R. (1986), „Diploid gynogenesis induced by heat shock after fertilization with the UV-irradiated sperm of common carp", *Aquaculture*, nr. 54, pp. 69-76.
130. HORVATH, L., ORBAN, L. (1995), „Genome and gene manipulation in common carp", *Aquaculture*, nr. 129, (1-4), pp. 157-183.
131. HOULE, D., MEZEY, J., GALPERN, P. (2002), „Interpretation of the results of common principal components analysis", *Evolution*, nr. 56 (3), pp. 433-440.

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

132. HOWES, G.J. (1991), „Systematics and biogeography: an overview", în: I.J. Winfield, J.S. Nelson (Ed.), *Cyprinid fishes: Systematics, biology and exploitation*, Chapman &Hall. London, pp. 1-33.
133. HULATA, G. (2001), „Genetic manipulations in aquaculture: a review of stock improvement by classical and modern technologies", *Genetica*, nr. 111, pp. 155-173.
134. HUSON, D., SMITH, K., WARNOW, T. (1999), „Correcting large distances for phylogenetic reconstruction", *Proc. 3rd International Workshop Alg. Engineering.*, Vol. 1668 of Lecture Notes in Computer Science, Springer Verlag, pp. 273-286.
135. HUSSAIN, M.G., CHATTERGI, A., McANDREW, B.J., JOHNSTONE, R. (1991), „Triploidy induction in Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* L. using pressure, heat and cold shocks", *Theory of Applicable Genetics*, nr. 81, pp. 6-12.
136. HUXLEY, J. (1974), *Evolution – the modern synthesis*; Third Edition, Baker, Allen & Unwin Ltd, pp. 565-566.
137. IGUCHI, K., YAMAMOTO, G., MATSUBARA, N., NISHIDA, M. (2003), „Morphological and genetic analysis of fish of a Carassius complex (*Cyprinidae*) in Lake Kasumigaua with reference to the taxonomic status of two all-female triploid morphs", *Biol. J. Linn. Soc.*, London, nr. 79, pp. 351-357.
138. IJIRI, K., EGAMI, N. (1980), „Hertwig effect caused by UV-irradiation of sperm of Oryazis latipes (Teleost) and its photoreactivation", *Mut. Res.*, nr. 69, pp. 241-248.
139. IMSIRIDOU, A., ZALDIVAR, J.M. (1999), *Methodology and formats for genetic identification of fish species*. Joint Research Centre, pp. 1-36.
140. INGRAM, V.M. (1963), *The hemoglobins in genetics and evolution*, Columbia University Press, New York (abstract).
141. IORGULESCU, D.C., MISĂILĂ, C., COSTINIUC, C.D. (2002), „Preliminary studies regarding conditions of gynogenesis induction in pike (*Esox lucius*) and common carp (*Cyprinus carpio carpio*)", *An. Şt. ale Univ. „Al.I. Cuza"*, seria Biologie Animală, Tom XLVII, pp. 257-265.
142. JAMESON, B.A., WOLF, H. (1988), „The antigenic index: a novel algorithm for predicting antigenic determinants", *CABIOS*, vol. 4, pp. 181-186.
143. KARAKOUSIS, Z., MACHORDOM, A., DOADRIO, I., ECONOMIDIS, P.S. (1995), „Phylogenetic relationships of Barbus peloponensis

BCU IAŞI - UNIVERSITY LIBRARY

Valenciennes, 1842 (Osteichthyes: Cyprinidae from Greece and other speciei of barbus as revealed by allozyme electrophoresis", *Biochem. System. Ecol.*, nr. 23, pp. 39-45.

144. KARPLUS, P.A., SCHULTZ, G.E. (1985), „Prediction of chain flexibility in proteins", *Naturwissenschaften*, nr. 72, pp. 212-213.
145. KAVUMPURATH, S., PANDIAN, T.J. (1994), „Induction of heterozygous and homozygous diploid gynogenesis in *Betta splendens* (Regan) using hydrostatic pressure", *Aquaculture and Fisheries Management*, nr. 25 (1), pp. 133-143.
146. KIDD, K.K., SGARAMELLA-ZONTA, L.A. (1971), „Phylogenetic analysis: Concepts and methods", *Am. J. Hum. Genet.*, nr. 23, pp. 235-252.
147. KIMURA, M., OHTA, T. (1972), „On the stochastic model for estimation of mutational distance between homologous proteins", *J. Mol. Evol.*, nr. 2, pp. 87-90.
148. KIRPICHNIKOV, V.S. (1973), „On Karyotype Evolution in Cyclostomata and Pisces", *Ichthyologia*, nr. 5/1, pp. 55-77.
149. KIRPICINIKOV, V.S. (1987), *Genetische Grundlagen der Fischzuchtung*, Veb. Deut. Land. Berlin (abstract).
150. KOBAYASI, H. (1971), „A cytological study on gynogenesis of the triploid ginbuna (*Carassius auratus langsdorfii*)", *Zool. Mag.*, nr. 80 (9), pp. 316-322.
151. KOBAYASI, H., NAKANO, K., NAKAMURA, M. (1977), „On the Hybrids, 4n Ginbuna (*Carassius auratus langsdorfii*) x Kinbuna (*Carassius auratus*), and their chromosomes", *Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries*, nr. 43/1, pp. 31-37.
152. KOBAYASI, H. OCHI, H., TAKEUCHI, N. (1973), „Chromosome studies in the genus Carassius: Comparison of *C. auratus grandoculis*, *C. auratus buergeri* and *Carassius auratus langsdorfii*", *Japanese Journal of Ichthyology*, nr. 20 (1), pp. 83-88.
153. KOCHER, T.D., THOMAS, W.K., MEYER, A., EDWARDS, S.V., PAABO, S. (1989), „Dynamics of mitochondrial DNA evolution in animals: amplification and sequencing with conserved primers", *Proc. Nati. Acad. Sci. USA*, nr. 86, pp. 6196-6200.
154. KOCHER, T.D., WILSON, A.C. (1991), „Sequence evolution of mitocondrial DNA in humans and chimpanzees: Control region and protein coding region", *Evolution of life*, Springer Verlag, New York, pp. 391-413.

BCU Cluj / Central University Library

155. KOMEN, J., DUYNHOVER, J., RICHTER, C.J.J., HUSMAN, E.A. (1989), „Gynogenesis in common carp (*Cyprinus carpio* L.). I. Effects of genetic manipulation of sexual products and incubation of eggs", *Aquaculture*, nr. 69, pp. 227-239.
156. KREISER, B.R., MITTON, J.B., WOODLING, J.D. (2001), „Phylogeography of the plains killifish *Fundulus Zebrinus*", *Evolution*, nr. 55 (2), pp. 339-350.
157. KUMAR, S. (1996), „A stepwise algorithm for finding minimum evolution trees", *Mol. Biol. Evol.*, nr. 13 (4), pp. 584-593.
158. KUMAR, S., TAMURA, K., JAKOBSEN, I.B., NEI, M. (2001), „MEGA2: molecular evolutionary genetics analysis software", *Bioinformatics*, nr. 17, pp. 1244–1245.
159. KUMAR, S., GADAGKAR, S.R. (2000), „Efficiency of the neighbor-joining method in reconstructing deep and shallow evolutionary relationships in large phylogenies", *J. Mol. Evol.*, nr. 51, pp. 544-553.
160. KYTE, J., DOOLITTLE, R.F. (1982), „A simple method for displaying the hydropathic character of a protein", *Jour. Mol. Biol.*, nr. 157, pp. 105-132.
161. LARGET, B., SIMON, D., KADANE, J. (2002), „Bayesian phylogenetic inference from animal mitochondrial genome arrangements", *J. Royal Stat. Soc. B.*, nr. 64 (4), pp. 681-694.
162. LARHAMMAR, D., RISINGER, C. (1994), „Molecular genetic aspects of tetraploidy in the common carp Cyprinus carpio", *Mol. Phylogenet. Evol.*, nr. 3, pp. 59-68.
163. LEFEBVRE, J.F., EL-MABROUK, N., TILLIER, E., SANKO, D. (2003), „Detection and validation of single gene inversions", *Proc. 11th International Conf. on Intelligent Systems for Mol. Biol.*, vol. 19 of Bioinformatics. Oxford U. Press, pp. 1190-1196.
164. LEVIN, D.A. (1979), *Hybridization – an evolutionary perspective*, Dowden, Hutchinson & Rose, Inc. Stroudsburg, Pennsylvania (abstract).
165. LEWIN, B. (1987), *Genes III (Third Edition)*. John Wiley & Sons, New York, Chichester, Brisbane, Toronto, Singapore, pp. 226-237.
166. LEWIS, J., WOLPERT, L. (1979), „Diploidy, evolution and sex", *J. Theor. Biol.*, nr. 78, pp. 425-438.
167. LEWONTIN, R.C. (1978), „Adaptation", *American Scientist*, nr. 239, pp. 157-169.

BCU CLUJ / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

168. LINDER, C., MORET, B., NAKHLEH, L., WARNOW, T. (2004), *Network (reticulated) evolution: Biology, models, and algorithms*. Prezentare disponibilă la: compbio.unm.edu/papers.html.
169. LINHART, O., KVASNICKA, P., SLECHTOVA, V., POKORNY, J. (1986), „Induced gynogenesis by retention of the second polar body in tha common carp, Cyprinus carpio L., and heterozigosity of gynogenetic progeny in trensferrin and Ldh-B1 loci", *Aquaculture*, nr. 54, pp. 63-67.
170. LIOR, D., BLUM, S., FELDMAN, W.M., LAVI, U., HILLEL, JOSSI (2003), „Recent duplication of the common carp (Cyprinus carpio L.) genome as revealed by analyses of microsatellite loci", *Mol. Biol. Evol.*, nr. 20 (9), pp. 1425-1424.
171. LISKER, R., ARMENDARES, S. (2000), *Introducción a la Genética Humana*, primera edición Editorial El Manual Moderno México D.F., pp. 1-20.
172. LIU, T., MORET, B., BADER, D. (2003), *An exact, linear-time algorithm for computing genomic distances under inversions and deletions*, Tech. Rep., Univ. of New Mexico, p. 31.
173. LUDWIG, A., MAY, B., DEBUS, L., JENNECKENS, I. (2000), „Heteroplasmy in the mtDNA control region of sturgeon", *Genetics*, nr. 156, pp. 1933-1947.
174. LUKOWICZ, M. (1980), „Intensitätistufen der modernen Aquakultur", *Intens. Fisch, Moglichkeitem und Probleme der modernen Aqukultur*, p. 56.
175. LUKOWICZ, M. (1985), „Fischzucht in China", *Fisch. m. Teichwirt*, nr. 3 (abstract).
176. LUSTUN, V., VOICAN, V., RĂDULESCU, I. (1978), *Dicţionar piscicol*, Editura Ceres, Bucureşti, p. 63.
177. MADDISON, W. (1990), „A method for testing the correlated evolution of two binary characters: are gains or losses concentrated on certain branches of a phylogenetic tree?", *Evol.*, nr. 44, pp. 539-557.
178. MADDISON, W. (1997), „Gene trees in species trees", *Syst. Biol.*, nr. 46, pp. 523-536.
179. MADDISON, W., MADDISON, D.R. (1992), *MacClade: Analysis of phylogeny and character evolution*, Sinauer Associates, Sunderland (abstract).
180. MAKEEVA, A.P., VERIGIN, B.V. (1974), „Gibrid karpa sz belüm tolsztolobikom", *Genetika*, T. 10, nr. 2, p. 73.

BCU IAŞI - LIBRARY

181. MARGOLIASH, E. (1963), „Primary structure and evolution of cytochrome c", *Proc. Natl., Acad. Sci. USA*, nr. 50, pp. 672-679.
182. MÁRIÁN, T., KRASZNAI, Z. (1978), „Comparative karyological investigations on chinese carps", International seminary on *Increasing the productivity of fishes by selection and hybridisation*, Szarvas, pp. 79-97.
183. MARRON, M., SWENSON, K., MORET, B. (2003), „Genomic distances under deletions and insertions", *Proc. 9th Int'l Conf. Computing and Combinatorics*, vol. 2697: *Lecture Notes in Computer Science*, Springer Verlag, pp. 537-547.
184. MARTIN, A. (2001), „The phylogenetic placement of Chondrichtyes: inferences from analysis of multiple genes and implications for comparative studies", *Genetica*, nr. 111, pp. 349-357.
185. MAS, EVA, POZA, J.; CIRIZA, JESÚS (2001), „Fundamento de la reacción en cadena de la Polimerasa", *Revista Acuatic*, nr. 15, Universidad de Zaragoza, España, pp. 1-20.
186. MASUDA, H., AMAOKA, K., ARAGA, C., UYENO, T., YOSHINO, T. (1984), *The fishes of the Japanese Archipelago*, Tokai University Press, Tokyo, Japan, vol. 1, p. 57.
187. MATEI, D. (1990), *600 de ani de atestare a pisciculturii în Moldova (sec. XIV-XX) şi 35 de ani de activitate ştiinţifică în sprijinul producţiei piscicole 1954-1989)*, Piscicultura Moldovei, Lucrările S.C.P. Piscicolă, Iaşi, vol.1, pp. 15-17.
188. MATEI, D. (1985), „Tehnologii de valorificare a potenţialului trofic şi piscicol al lacurilor de acumulare", *Consf. pt. probl. pisc. şi mec. ap. din sect. pisc.*, pp. 23-30.
189. MATHER, K., JINKS, J.L. (1971), *Biometrical Genetics*, Chapman and Hall Ltd, New Fetter Lane, London (abstract).
190. MATHEWS, Christopher (1999), *Bioquímica*, segunda edición MacGraw Hill España, pp. 94, 101-102, 114.
191. MATSUO, T., OGAWA, Y., KUMAMARU, A., OCHI, K., ADACHI, Y. (2000), „Complete nucleotide sequence of the Cytochrome b gene of channel catfish Ictalurus punctatus and comparison of sequence homology among channel catfish and other fishes", *Mol. Biol.*, pp 207-210.
192. MAXAM, A.M., GILBERT, W. (1977), „A new method for sequencing DNA", *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, nr. 74, pp. 560-564.

BCU IAŞI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

193. MAXIMILIAN, C., IOAN, DOINA MARIA (1984), *Dicţionar de genetică*, Editura Ştiinţifică şi Enciclopedică, Bucureşti, p. 27.
194. MELTON, T. (2002), „Mitochondrial DNA", *Mitotyping Technologies*, pp. 1-4.
195. MILLER-TAILLON, PATRICIA, PIERNOT, ELLEN, KWOK, P.Y. (1999), „Efficient approach to unique single-nucleotide polymorphism discovery", *Genom Research*, nr. 9, pp. 499-505.
196. MINCIU, DOINA-RODICA, BĂRA, I.I. (1985), „Studiul complementului cromosomial la *Pseudorasbora parva* (*Schlegel*) (*Pisces*, *Cyprinidae*)", Sem. Ştiinţ. *Progrese în ameliorarea şi tehnologia creşterii animalelor în sistem intensiv*, Timişoara (abstract).
197. MINCIU, DOINA-RODICA (1991), „Posibilităţi de corelare a unor proteine polimorfe cu anumiţi indici morfoproductivi la peşti", *Ecologia et Aquacultura Limnica*, Piatra Neamţ, nr. 2 (11), pp. 195-200.
198. MIROL, PATRCIA, GARCIA PERAL, P., DULOUT, N.F. (2004), *Mitochondrial variability in the D-loop of four equine breeds shown by PCR-SSCP analysis*, Ed. Sociedade Brasileira de Genética, pp. 1-7.
199. MOAV, R., HULATA, G., WOHLFARTH, G. (1975), „Genetic differences between the Chinese and European races of the common carp. I: Analysis of genotype-enviroment interactions for growth rate", *Heredity*, nr. 34, pp. 323–340.
200. MONOD, J., FRANÇOIS, J. (1996), *Biología Molecular*, décimo segunda edición, Editorial Ciencia y Desarrollo México D.F., pp. 9-10.
201. MORET, B., BADER, D., WARNOW, T. (2002), „High-performance algorithm engineering for computational phylogenetics", *J. Supercomputing*, nr. 22, pp. 99-111.
202. MORET, B., ROSHAN, U., WARNOW, T. (2002), „Sequence length requirements for phylogenetic methods", *Proc. 2nd International Workshop Algs. in Bioinformatics*, vol. 2452: *Lecture Notes in Computer Science*, Springer Verlag, pp. 343-356.
203. MORET, B., TANG, J., WANG, L.S., WARNOW, T. (2002), „Steps toward accurate reconstructions of phylogenies from gene-order data", *J. Comput. Syst. Sci.*, nr. 65 (3), pp. 508-525.
204. MORET, B., TANG, J., WARNOW, T. (2005), „Reconstructing phylogenies from gene content and gene-order data", în: O. Gascuel (Ed.), *Mathematics of Evolution and Phylogeny*. Oxford University Press, pp. 321-352.

BCU IAŞI UNIVERSITY LIBRARY

205. MÜLLER, S. (1989), „Geschichte der Fiszucht in Europa", Teil VII: „Einige wichtige Etappen in der Entwicklung der Karpfenteichwirtschaft", *Z. Binnenfisch D.D.R.*, Berlin, nr. 36, pp. 10-14.
206. MURAKAMI, M., MATSUBA, C., FUJITANI, H. (2001), „The maternal origins of the triploid ginbuna (Carassius auratus langsdörfi); phylogenetic relationships within the Carassius auratus taxa by partial mitochondrial D-loop sequnecing", *Genes Genet. Syst.*, nr. 76 (1), pp. 25-32 (abstract).
207. NAGY, A., RAJKI, K., HORVATH, L., CSANYI, V. (1978), „Investigation on carp (*Cyprinus carpio* L.) gynogenesis", *J. Fish. Biol.*, nr. 13, pp. 215-224 (abstract).
208. NAGY, A., CSANYI, V., BAKOS, J., BERCSENYI, M. (1984), „Utilization of gynogenesis and sex-reversal in commercial carp breeding: growth of the first gynogenetic hybrids", *Aquacult. Hung.*, nr. 4, pp. 7-16.
209. NAKHLEH, L., ROSHAN, U., ST. JOHN, K., SUN, J., WARNOW, T. (2001), „Designing fast converging phylogenetic methods", *Proc. 9th International Conf. on Intelligent Systems for Mol. Biol.*, vol. 17 of Bioinformatics, Oxford U. Press, pp. S190-S198.
210. NAKHLEH, L., MORET, B., ROSHAN, U., JOHN, K.S., WARNOW, T. (2002), „The accuracy of fast phylogenetic methods for large datasets", *Proc. 7th Pacific Symp. On Biocomputing*, World Scientific Pub., pp. 211-222.
211. NEE, S. (2001), „Inferring speciation rates from phylogenies", *Evolution*, nr. 55 (4), pp. 661-668.
212. NEI, M. (1986), *Stochastic errors in DNA evolution and molecular phylogeny*. În *Evolutionary perspectives and the new genetics*, Ed. Alan R. Liss, New York, pp. 133-147.
213. NEI, M. (1991), „Relative efficiencies of different tree making methods for molecular data", în *Recent advances in phylogenetic studies of Dna sequences*, Oxford University Press, pp. 133-147.
214. NEI, M. (1996), „Phylogenetic analysis in molecular evoutionary genetics", *Annu. Rev. Genet.*, nr. 30, pp. 371-403.
215. NEI, M., TAJIMA, F. (1983), „Maximum likelihood estimation of the number of nucleotide sbstitutions from restriction sites data", *Genetics*, nr. 105, pp. 207-217.

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

216. NEI, M., TAJIMA, F., TATENO, Y. (1983), „Accuracy of estimated phylogenetic trees from molecular data II. Genes frequency data", *J. Mol. Evol.*, nr. 19, pp. 153-170.
217. NEI, M., MILLER, J.C. (1990), „A simple method for estimating average number of nucleotide substitutions within and between populations from restriction data", *Genetics*, nr. 125, pp. 873-879.
218. NEI, M., GU, X., SITNIKOVA, T. (1997), „Evolution by the birth-and-death process in multigene families of the vertebrate immune system", *Proc. Natl. Acad Sci. USA*, nr. 94, pp. 7799-7806.
219. NEI, M., KUMAR, S., TAKAHASHI, K. (1998), „The optimization principle in phylogenetic analysis tends to give incorrect topologies when the number of nucleotides or amino acids used is small", *PNAS*, nr. 95 (21), pp. 12390-12397.
220. NEI, M., KUMAR, S. (2000), *Molecular evolution and phylogenetics*, Oxford University Press.
221. NELSON, G.J. (1994), *Fishes of the world*, John Wiley & Sons, New York.
222. NICOLAU, AURELIA, BREZEANU, GH., CALOIANU, I., BUŞNIŢA, A. (1973), „Reproducerea artificială şi dezvoltarea la peşti", Editura Academiei R.S.R., Bucureşti (abstract).
223. NICOLESCU, CARMEN (2002), „Types of gynogenetic carps obtained using genetic manipulated gametes", *An. Şt. ale Univ. „Al.I. Cuza Iaşi"*, secţiunea II – „Genetică şi Biologie Moleculară", Tom III, pp. 68-77.
224. NICOLESCU, CARMEN (1994), „Das Studium der Wirksamkeit einiger Methoden in der genetischen Inaktivierung der Karpfengameten", *Analele Universităţii „Valachia" Târgovişte*, anul II, fascicola I, pp. 101-111.
225. NICOLESCU, CARMEN (1996), *Studiul genetic al unor forme de peşti obţinute prin manipulări genetice (ginogeneză, androgeneză, poliploidizare, hibridare interspecifică)* – teză de doctorat (rezumat).
226. NICOLESCU, CARMEN (1997), *Studiul eficienţei unor tehnici în diploidizarea meterialului genetic al gameţilor la crap*, „Al XXII-lea Congres al Academiei Româno-Americane de Ştiinţe şi Arte, 26-27 iunie 1997", vol. I, secţiunea V – „Ştiinţe medicale şi biologie", pp. 146-163.
227. NIXON, C.K., CARPENTER, J.M. (2000), „On the other phylogenetic systematics", *Cladistics*, nr. 16, pp. 298-318.

BCU IAŞI CENTRUL UNIVERSITAR LIBRARY

228. NOGUSA, S., (1960), „A comparative study of the chromosomes in fishes with particular considerations on taxonomy and evolution", *Mem. Univ. Agr.*, nr. 3., Hyogo, pp. 1-62.
229. NORMAN, A.J, PORTER, A.H. (2001), „Toward a new synthesis: population genetics and evolutionary developmental biology", *Genetica*, nr. 112-113, pp. 45-58.
230. NUŢĂ, GH., BUŞNEAG, C. (1977), *Investigaţii biochimice*, Editura Didactică şi Pedagogică, Bucureşti, pp. 188-189.
231. OBRHELOVA, N.P. (1971), „Vergleinchende osteologie der gattung *Leuciscus* (*Pisces*) aus tertiaren schichten der nordlichen und westlichen CSSR", *Paleontolog. Abhandl.*, nr. 4, pp. 549-660.
232. OHNO, S. (1970), *Evolution by gene duplication*, Springer Verlag, Berlin (abstract).
233. OJIMA, Y., HAYASHI, M., UENO, K. (1972), „Cytogenetic studies in lower vertebrates – Karyotype and DNA studies in 15 Species of Japanese Cyprinidae", *Genetics*, Japan, nr. 476, pp. 431-440.
234. OLSEN, G., MATSUDA, H., HAGSTROM, R., OVERBEEK, R. (1994), „Fast DNAmt: A tool for construction of phylogenetic trees of DNA sequences using maximum likelihood", *Computations in Applied Biosciences*, nr. 10 (1), pp. 41-48.
235. OPRESCU, S. (1980), *Introducere în citogenetica animală*, Ed. Ştiinţifică, Bucureşti.
236. ORNDUFF, R. (1979), „Reproductive biology in relation to sistematics", *Taxon*, nr. 18, pp. 121-133.
237. OWCZARZY, R., VALLONE, M.P., GALLO, J.F., PANER, T.M., LANE, M.J., BENIGHT, A.S. (1998), *Predicting sequence-dependent melting stability of the short duplex DNA oligomers*, John Wiley & Sons, pp. 217-239.
238. PÄÄBO, S. (1990), „Amplifying ancient DNA", în: M.A. Innis, D.H. Gelfand, J.J. Sninsky, T.J. White (Eds.), *PCR protocols: A guide to methods and applications*, Academic Press, San Diego, pp. 159-166.
239. PAAVER, T. (1983), „Biochimiceskaia genetika karpa *Cyprinus carpio* L.", *Akad. nauk Estonsk. S. S. R. Inst. Zool. Bot.*, pp. 85-92.
240. PAGE, R. (1998a), *Introduction to tree building*, DEEB IBLS, University of Glasgow, pp. 1-5.
241. PAGE, R. (1998b), „GeneTree: comparing gene and species phylogenies using reconciled trees", *Bioinf.*, nr. 14 (9), pp. 819-820.

BCU CLUJ CENTRALA LIBRARY

242. PAGE, R., CHARLESTON, M. (1997a), „From gene to organismal phylogeny: Reconciled trees and the gene tree/species tree problem", *Mol. Phyl. Evol.*, nr. 7, pp. 231-240.
243. PAGE, R., CHARLESTON, M. (1997b), „Reconciled trees and incongruent gene and species trees", în: B. Mirkin, F.R. McMorris, F.S. Roberts, A. Rzehtsky, (Eds.), *Mathematical Hierarchies in Biology*, American Math. Soc., vol. 37., pp. 57-70.
244. PALUMBI, S.R. (1996), „Nucleic Acids II: The polymerase chain reaction, în Molecular systematics", 2nd ed., Sinauer Assoc., Sunderland MA, Chapter 7, pp. 205-317.
245. PALUMBI, S.R., CIPRIANO, F., HARE, M.P. (2001), „Predicting nuclear gene coalescence from mitochondrial data: the three-times rule", *Evolution*, nr. 55 (5), pp. 859-868.
246. PAMILO, P., NEI, M. (1998), „Relationship between gene trees and species trees", *Mol. Biol. Evol.*, nr. 5, pp. 568-583.
247. PETRE, A., NEGRUȚIU, E. (1975), *Genetică animală*, Editura Didactică şi Pedagogică, Bucureşti, pp. 237-260.
248. PIONTKIVSKA, H., ROONEY, A.P., NEI, M. (2002), „Purifying selection and birth-and-death evolution in the histone H4 gene family", *Mol. Biol. Evol.*, nr. 19, pp.689-697.
249. POJOGA, I. (1977a), *Piscicultura modernă în apele interioare*, Editura Ceres, Bucureşti, 34-58.
250. POJOGA, I. (1977 b), *Piscicultura*, Editura Ceres, Bucureşti, pp. 15-33.
251. POJOGA, I., NEGRIU, R. (1988), *Piscicultura practică*, Editura Ceres, Bucureşti, p. 67.
252. POSADA, D., CRANDALL, KEITH (1998), „Modeltest: testing the model of DNA substitution", *Bioinformatics applications note*, vol. 14, nr. 9, pp. 817-818.
253. PRESCOTT, L.M., HARLEY JOHON, P. (1999), *Microbiología*, cuarta edición, Editorial MacGraw Hill Madrid España, pp. 320-344.
254. QUILLET, E. (1994), „Survival growth and reproductive traits in mitotic gynogenetic rainbow trout females", *Aquaculture*, nr. 123, pp. 223-237.
255. QUINTEIRO, J., VIDAL, R., MENDEY, M.R. (2000), „Phylogeny and biogeographic history of hake (genus Merluccius), inferred from mitochondrial DNA control region sequences", *Marine Biology*, nr. 136, pp. 163-174.

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

256. RAICU, P. (1980), *Genetica*, Editura Didactică şi Pedagogică, Bucureşti, pp. 533-553.
257. RAICU, P., TAISESCU, ELENA, CRISTIAN, ALEXANDRINA (1972), „Diploid chromosome complement of the carp", *Cytologia*, nr. 37 (2), pp. 355-358.
258. RAM, J.L., RAM, M.L., BALDOUN, F.F. (1996), „Identification of canned tuna and bonito by sequence and restriction site analysis of polymerase chain rection products of mitochondrial DNA", *J. Agric. Food. Chem.*, nr. 44, pp. 2460-2467.
259. RANNALA, B., YANG, Z. (1996), „Probability distribution of molecular evolutionary trees: a new method of phylogenetic inference", *J. Mol. Evol.*, nr. 43, pp. 304-311.
260. RJABOV, I.N. (1975), *Oszobennoszti embrional, no-licsinocsnogo razvitija gibridov karpa (Cyprinus carpio L.) i koreszkoj vosztrobrjuski Hemiculter eignmanni*, Jordan et Metz., Vopr. Ihtiol., T. 15 vüp. 3 (abstract).
261. ROKAS, A., HOLLAND, P.W.H. (2000), „Rare genomic changes as a tool for phylogenetics", *Trends in Ecol. and Evol.*, nr. 15, pp. 454-459.
262. RÖGL, F., STEININGER, F.F. (1983), „Vom Zarfall der Tethys zu Mediterran und Paratethys. Die neogene palaösgegraphie und palinspastik des zirkum-mediterranen Raumes", *Ann. Naturhist. Mus. Wien*, nr. 85A, pp. 135-163.
263. RYMAN, N., JORDE, P.E. (2001), „Statistical power when testing for genetic differentiation", *Mol. Ecol.*, nr. 10, pp. 2361-2373.
264. RZHETSKY, A., NEI, M. (1992), „A simple method for estimating and testing minimum –evolution trees", *Mol. Biol. Evol.*, nr. 9, pp. 945-967.
265. RZHETSKY, A., NEI, M. (1992), „Statistical properties of the ordinary least squares, generalized least-squares, and minimum-evolution methods of phylogenetic inference", *J. Mol. Evol.*, nr. 35, pp. 367-375.
266. RZHETSKY, A., NEI, M. (1993), „Theoretical foundation of the minimum-evolution method of phylogenetic inference", *Mol. Biol. Evol.*, nr. 10, pp. 1073-1095.
267. RZHETSKY, A., NEI, M. (1995), „Tests of applicability of several substitution models for DNA sequence data", *Mol. Biol. Evol.*, nr. 12, pp. 131-151.
268. SACCONE, C., ATTIMONELLI, M., SBISA, E. (1987), „Structural elements highly preserved during the evolution of the D-loop-

containing region in vertebrate mitochondrial DNA", *J. Mol. Evol.*, nr. 26, pp. 205-211.

269. SAITOU, N., IMANISHI, M. (1989), „Relative efficiencies of the Fitch-Margoliash, maximum-parsimony, maximum-likelihood, minimum-evolution, and neighbor-joining methods of phylogenetic reconstructions in obtaining the correct tree", *Mol. Biol. Evol.*, nr. 6, pp. 514-525.
270. SAITOU, N., NEI, M. (1987), „The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees", *Mol. Biol. Evol.*, nr. 4, pp. 406-425.
271. SAMONTE, I.E., PAGULAYAN, R.C., MAYAER, W.E. (2000), „Molecular phylogeny of Philippine freshwater sardines based on mitochondrial DNA analysis", *Journal of Heredity*, nr. 91, pp. 247-253.
272. SANGER, F., AIR, G.M., BARELL, B.G., BROWN, N.L., COULSON, A.R., FIDDES, C.A. (1977), „Nucleotide sequence of bacteriophage ØX174 DNA", *Nature*, nr. 265, pp. 687-695.
273. SANKO, D., NADEAU, J. (1996), „Conserved synteny as a measure of genomic distance", *Disc. Appl. Math.*, nr. 71, pp. 247-257.
274. SCHÄPERKLAUS, W. (1961), *Lehrbuch der Teichwirtschaft*, Aufl. Paul Perey, Berlin, Hamburg (abstract).
275. SCHULTZ, R.J. (1967), „Gynogenesis and triploidy in the viviparous fish Poeciliopsis", *Science*, nr. 157, pp. 1564-1567.
276. SHELTON, W.L. (1986), „Control of sex in Cyprinids for aquaculture", în: R. Billard, J. Marcel (Eds.), *Aquaculture of Cyprinids*, I.N.R.A., Paris.
277. SHEN, S.C. (1993), *Fishes of Taiwan*, Department of Zoology, National Taiwan University, Taipei, p. 960.
278. SITNIKOVA, T., RZHETSKY, A., NEI, M. (1995), „Interior branch and bootstrap tests of phylogenetic trees", *Mol. Biol. Evol.*, nr. 12, pp. 319-333.
279. SNEATH, P.H.A., SOKAL, R.R. (1973), *Numerical taxonomy*, Freeman, San Francisco CA. (abstract).
280. SNEDECOR, G.W. (1968), *Metode statistice aplicate în cercetările de agricultură şi biologie*, Editura Didactică şi Pedagogică, Bucureşti, p. 37.
281. SOKAL, R.R., MICHENER, C.D. (1958), „A statistical method for evaluating systematic relationships", *Univ. Kansas Sci. Bull.*, nr. 28, pp. 1409-1438.

BCUIAŞI CONCEPT LIBRARY

282. SOKAL, R.R., SNEATH, P.H.A. (1963), *Principles of numerical taxonomy*. Freeman, San Francisco CA. (abstract).
283. SOURDIS, J., NEI, M. (1988), „Relative efficiencies of the maximum parsimony and distance-matrix methods in obtaining the correct phylogenetic tree", *Mol. Biol. Evol.*, nr. 5, pp. 298-311.
284. SPIRIN, A. (1958), „Spektrofotometriceskoe opredelenie summarnovo kolicestva nucleinovih kislot", *Biohimia*, p. 656.
285. STAN, T. (1985), *Piscicultura*, lucr. practice, lito. I. A. Iaşi, pp. 15-16.
286. STAN, T., PĂSĂRIN, B. (1996), *Acvacultură*, Universitatea Agronomică şi de Medicină Veterinară „Ion Ionescu De la Brad", Iaşi, p 31.
287. STEBBINS, G.L. (1969), *The basis of progressive evolution*, Univ. North Carolina Press, Chapel Hill (abstract).
288. STUART, G.W., MOFFETT, KAREN, LEADER, J.J. (2002), „A comprehensive vertebrate phylogeny using vector representations of protein sequences from whole genomes", *Mol. Biol. Evol.*, vol. 19, nr. 4, pp. 554-562.
289. SUCIU, MARIA, POPESCU, ALEXANDRINA (1981), *Lucrări practice de zoologie*, Editura Didactică şi Pedagogică, Bucureşti, ediţia a II-a.
290. SUSKO, E., INAGAKI, Y., ROGER, A.J. (2004), „On Inconsistency of the Neighbor-Joining, Least Squares, and Minimum Evolution Estimation When Substitution Processes Are Incorrectly Modeled", *Mol. Biol. Evol.*, vol 21 nr. 9, pp. 1629-1642.
291. SWOFFORD, D.L., BEGLE, D.P. (1993), „PAUP: Phylogentic analysis using parsimony, ver. 3.1. users manual", *Illinois Natural History Survey*, Champaign, pp. 74-102.
292. TAISESCU, ELENA (1979), *Studiul complementului cromosomial la unele specii de peşti din fauna ţării noastre*, Teză Dr., Fac. Biol., Univ. Bucureşti (rezumat).
293. TAKAHASHI, K., NEI, M. (2000), „Efficiencies of fast algorithms of phylogenetic inference under the citeria of Maximum-Parsimony, Minimum Evolution, and Maximum Likelihood when a large number of sequences are used", *Mol. Biol. Evol.*, nr. 17 (8), pp. 1251-1258.
294. TAKEZAKI, N., NEI, M. (1994), „Inconsistency of the maximum parsimony method when the rate of nucleotide substitution is constant", *J. Mol. Evol.*, nr. 39, pp. 210-218.
295. TAKEZAKI, N. (1998), „The trees generated by distance methods of phylogenetic reconstruction", *Mol. Biol. Evol.*, nr. 15, pp. 727-737.

BCU IAŞI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

296. TAKEZAKI, N., NEI, M. (1996), „Genetic distances and reconstruction of phylogenetic trees from microsatellite DNA", *Genetics*, nr. 144, pp. 389-399.

297. TAKEZAKI, N., GOJOBORI, T. (1999), „Correct and incorrect vertebrate phylogenies obtained by the entire mitochondrial DNA sequences", *Mol. Biol. Evol.*, nr. 16, pp. 590-601.

298. TAMURA, K. (1992), „Estimation of the number of nucleotide substitution when there are strong transition-trensversion and G+C content biases", *Mol. Biol. Evol.*, nr. 9, pp. 678-687.

299. TAMURA, K., NEI, M. (1993), „Estimation of the number of nucleotide substitutions in the control region of mitochondrial DNA in humans and chimpanzees", *Mol. Biol. Evol.*, nr. 10, pp. 512-526.

300. TANG, J., MORET, B. (2003), „Phylogenetic reconstruction from gene rearrangement data with unequal gene contents", *Proc. 8th International Workshop on Algs. and Data Structures*, Vol. 2748 of Lecture Notes in Computer Science, Springer Verlag, pp. 37-46.

301. TANG, J., MORET, B., CUI, L., DEPAMPHILIS, C. (2004), „Phylogenetic reconstruction from arbitrary gene-order data", *Proc. 4th IEEE Symp. on Bioinformatics and Bioengineering*, IEEE Press, Piscataway, NJ, pp. 592-599.

302. TATSUO, O., CHAUDHRY, M.S., SOHAIL, B., MASATOSHI, Y., NOR, A.H., HIDEKI, E., HISASHI, Y., RYUICHI, M. (2004), „Phylogenetic position of the small Kashmir flying squirrel, Hylopetes fimbriatus (≡ Eoglaucomys fimbriatus), in the subfamily Pteromyinae", *Can. J. Zool./Rev. Can. Zool.*, nr. 82 (8) pp. 1336-1342.

303. TEROL, J., MASCARELL, ROSARIO, FERNANDEZ-PEDROSA, VICTORIA, PEREY, A.M. (2002), „Statistical validation of the identification of tuna species: bootstrap analysis of mitochondrial DNA sequences", *J. Agric. Food Chem.*, nr. 50, pp. 963-969.

304. THOMPSON, J.D. , Higgins, D.G., Gibson, T.J. (1994), „Clustal W: Improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice", *Nucleic Acids Research*, Vol. 22, pp. 4673-4680.

305. VAITHILIMGAM, G., RAMANA, T. (1988), *Technics for chromosome analisis*, The University of Texas Health Science Center at Dallas, Texas (abstract).

BCU IAȘI - BIBLIOTECA CENTRALĂ

306. VAN VELLER, M.G.P., KORNET, D.J., ZANDEE, M. (2000), „Methods in vicariance biogeography: assessment of implementation of assumption 0, 1 and 2", *Cladistics*, nr. 16, pp. 319-345.
307. VARVARA, M., ZAMFIRESCU, Ş., NEACŞU, P. (2001), *Lucrări practice de ecologie*, Editura Univ. „Al.I. Cuza" Iaşi, pp. 2-25.
308. VASCO, A.D., CRANDALL, A.K., FU, Y.X. (2001), „Molecular populations genetics: coalescent methods based on summary statistics", în: Allen G. Rodrigo, Gerald H. Learn, Jr. (Eds), *Computational and Evolutionary Analysis of HIV Molecular Sequences,* Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands, pp. 173-216.
309. VASZJILJEV, V.P., MAKEEVA, A.P., RJABOV, I.N. (1975), „O Triploidii Gibridov Karpa sz Drugimi Predsztaviteljami Szemejsztva Cyprinidae", *Genetika*, T. XI, No. 8 (abstract).
310. VOICAN, V., LUSTUN, L., RĂDULESCU, I. (1975), *Practica selecţiei şi reproducerii la peşti*, Editura Ceres, Bucureşti.
311. VOLCKAERT, F.A.M., GALBUSERA, P.H.A., HELLEMANS, B.A.S., Van den HAUTE, C., VANSTAEN, D., OLLEVIER, F. (1994), „Gynogenesis in the African catfish (Clanas gariepinus). I. Induction of meiogynognesis with thermal and pressure shocks", *Aquaculture*, nr. 128, pp. 221-235.
312. YANG, Y.P., WOMACK, J.E. (1998), „Parallel radiation hybrid mapping: a powerful tool for high-resolution genomic comparison", *Genome Research*, nr. 8, pp. 731-736.
313. YANG, Z. (1996), „Maximum-likelihood model for combined analyses of multiple sequence data", *J. Mol. Evol.*, nr. 42, pp. 587-596.
314. YANG, Z. (1996), „Phylogenetic analysis using parsimony and likelihood methods", *J. Mol. Evol.*, nr. 42, pp. 294-307.
315. WAKELEY, J. (1993), „Substitution rate variation among sites in hypervariable region I of human mitochondrial DNA", *J. Mol. Evol.*, nr. 37, pp. 613-623.
316. WAKELEY, J. (1994), „Substitution rate variation among sites and the estimation of transition bias", *Mol. Biol. Evol.*, nr. 11, pp. 436-442.
317. WANG, H.Y., LEE, S.C. (2002), „Secondary structure of mitochondrial 12S rRNA among fish and its phylogenetic applications", *Mol. Biol. Evol.*, nr. 19, pp. 138-148.

BCU

318. WANG, L.S., WARNOW, T. (2001), „Estimating true evolutionary distances between genomes", *Proc. 33rd Ann. ACM Symp. Theory of Comput.*, ACM Press, New York, pp. 637-646.
319. WANG, L.S., JANSEN, R., MORET, B., RAUBESON, L., WARNOW, T. (2002), „Fast phylogenetic methods for genome rearrangement evolution: An empirical study", *Proc. 7th Pacific Symp. on Biocomputing*, World Scientific Pub., pp. 524-535.
320. WANG, L.S., WARNOW, T. (2005), „Distance-based genome rearrangement phylogeny", în: O. Gascuel (Ed.), *Mathematics of Evolution and Phylogeny*. Oxford University Press, pp. 353-383.
321. WELCOMME, R.L. (1988), *International introductions of inland aquatic species*, Rome, FAO (abstract).
322. WERNER, S. (1979), *Industrienmäßige fischproduktion*, Deutscher Landswirtschaftsverlag, Berlin (abstract).
323. WHEELER, W. (2001), „Homology and the optimization of DNA sequence data", *Cladistics*, nr. 17, pp. 5-11.
324. WILLIAMS, G.C. (1966), *Adaptation and natural selection. A critique of some current. Evolutionary thought*, Princeton Univ. Press. (abstract).
325. WILEY, E.O. (1981), *Phylogenetics: The theory and practice of phylogenetic systematics*, Wiley Interscience, New York (abstract).
326. WILEY, E.O., BROOKS, D.R., SIEGEL-CAUSEY, D., FUNK, V.A. (1991), *The Compleat cladist: A primer of phylogenetic procedures*, University of Kansas, Museum of Natural History, Special Publication no. 19, Lawrence, Kansas (abstract).
327. WILLS, C. (1981), *Genetic variability*, Clarendon Press, Oxford (abstract).
328. WILSON, A.C., CARLSON, S.S., WHITE, T.J. (1977), „Biochemical Evolution", *Annu. Rev. Biochem.*, nr. 46, pp. 573-639.
329. WOLF, C., RENTSCH, J., HUBNER, P. (1999), „PCR-RFLP analysis of mitochondrial DNA: a reliable method for species identification", *J. Agric. Food Chem.*, nr. 47, pp. 1350-1355.
330. WOO-JAI, L., CONROY, JANET, HOWELL, H.W., KOCHER, T.D. (1995), Structure and evolution of teleost mitochondrial control regions", *J. Mol. Evol.*, nr. 41, pp. 54-66.
331. WU, C., YE, Y., CHEN, R. (1986), „Genome manipulation in carp (*Cyprinus carpio* L.), *Aquaculture*, nr. 54, pp. 57-61.
332. ZARDOYA, R., MEYER, A. (1996), „Phylogenetic performance of mitochondrial protein-coding genes in resolving ralationships among vertebrate", *Mol. Biol. Evol.*, nr. 13 (7), pp. 933-942.

B.C.U. „M. EMINESCU" IAȘI
BIOLOGIE

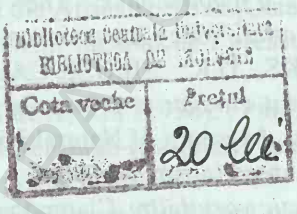
333. ZARDOYA, R., DOADRIO, I. (1998), „Phylogenetic relationships of Iberian cyprinids: systematic and biogeographical implications", *Proc. R. Soc. Lond.*, vol. 265, nr. 1403, pp. 1365-1372.

334. ZARDOYA, R., ECONOMIDIS, P.S., DOADRIO, I. (1999), „Phylogenetic relationships of Greek Cyprinidae: molecular evidence for at least two independent origins of the Greek cyprinid fauna", *Molecular Phylogenetics and* Evolution, nr. 13, pp. 122-131 (abstract).

335. ZHANG, H., OKAMOTO, N., IKEDA, Y. (1995), „Two c-myc genes from a tetraploid fish, the common carp (*Cyprinus carpio*)", *Gene*, nr. 153, pp. 231-236.

336. ZHANG, J., ROSENBERG, H.F., NEI, M. (1998), „Positive Darwinian selection after gene duplication in primate ribonuclease genes", *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, nr. 95, pp. 3708-3713.

337. ZUCKERKANDL, E., PAULING, L. (1962), „Molecular disease, evolution and genetic heterogenity", *Horizons in biochemistry*, Acad. Soc. New York. pp. 189-25.



BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

TIPARUL EXECUTAT LA
IMPRIMERIA EDITURII UNIVERSITĂȚII
„ALEXANDRU IOAN CUZA" DIN IAȘI
700511 Iaşi, Păcurari 9, tel./fax 0232 314947
Format: 70×100/16
Coli tipo: 25,125
Apărut: 2007
Comanda: 334

Informații și comenzi:
www.editura.uaic.ro
editura@uaic.ro

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Dragoş Lucian Gorgan

FILOGENIE MOLECULARĂ

ÎN CADRUL GENURILOR *CYPRINUS* ŞI *CARASSIUS*

Această lucrare furnizează informaţii esenţiale care permit iniţierea şi realizarea unor studii de genetică moleculară, filogenie, filogeografie şi chiar ecologie moleculară. Cartea prezintă detaliat cele mai recente metode utilizate în astfel de studii, începând cu extracţia şi purificarea ADN, până la secvenţiere şi prelucrarea informaţiilor furnizate de secvenţele markerilor moleculari. În text sunt incluse şi explicate modelele care au contribuit la înţelegerea direcţiilor de diferenţiere a speciilor şi subspeciilor pentru reprezentanţi ai familiei *Cyprinidae*. Cartea atrage atenţia asupra studiilor efectuate pe specii ca *Cyprinus carpio* L., 1785, şi *Carassius gibelio* Bloch., 1782, dar metodele pot fi folosite şi adaptate în studiul altor grupe de organisme, adresându-se celor interesaţi de biologie şi genetică moleculară, biochimie şi ihtiologie.

www.editura.uaic.ro

ISBN: 978-973-703-209-6

ISBN 973-703-209-8

9 789737 032096

Editura Universităţii „Alexandru Ioan Cuza" Iaşi

BCU IAŞI / UNIVERSITY LIBRARY